



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**IMPRESSÃO EM 3D DE ZIRCÓNIA ESTABILIZADA COM ÍTRIA-
“ESTUDO IN VITRO”**

Trabalho submetido por
Flávia Patrícia Pereira Neto
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

IMPRESSÃO EM 3D DE ZIRCÓNIA ESTABILIZADA COM ÍTRIA- “ESTUDO IN VITRO”

Trabalho submetido por
Flávia Patrícia Pereira Neto
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Pedro Oliveira

e coorientado por
**Prof. Doutora Madalena Oom, Prof. Doutor José Martins dos Santos, Prof.
Doutora Isabel Ferreira, Prof. Doutor João Paulo Borges**

outubro de 2017

Medo = morte pelo erro de desistir ousar.

Ametace Dudonav

Agradecimentos

Difícilmente será concebível o desenvolvimento de um projeto científico de forma autónoma e desprovida de qualquer colaboração. Tive o imenso privilégio e orgulho de me envolver neste projeto com o meu orientador Prof. Doutor Pedro Oliveira e com os meus co-orientadores Prof. Doutora Madalena Oom, Prof. Doutor José Martins dos Santos, Prof. Doutora Isabel Ferreira e Prof. Doutor João Paulo Borges.

Foram oito meses, de dias de trabalho intenso, dias onde a ciência não colaborava, dias com pressão, mas no fim, os que ficam na memória são os momentos de apoio e de aprendizagem. Tive a oportunidade de trabalhar com uma grande profissional, Professora Doutora Madalena Oom, que foi fundamental e decisiva em todo este trabalho. Agradeço por toda ajuda.

Ao Professor Doutor José Martins dos Santos pela confiança, que me permitiu concretizar o estudo.

Ao meu orientador, Professor Doutor Pedro Oliveira, pela confiança desde início sobre este projeto tão ambicioso, por todo o apoio e disponibilidade que sempre demonstrou para comigo.

Aos professores Doutores Isabel Ferreira e João Paulo Borges pela ajuda e disposição que sempre demonstraram. À colega Ana Gaspar pela confeção do material em estudo.

Aos meus pais pelo amor e apoio. À minha irmã, pela ajuda, sem ela seria impossível. Agradeço também pela ajuda decisiva do Guilherme.

Ao Bruno, o meu apoio incondicional. Muito obrigada pela paciência, compreensão, persistência e ajuda.

Por último, agradeço aos meus amigos. Sobretudo, agradeço à Margarida e à Catarina, por ao longo destes cinco anos, serem as irmãs e amigas confidentes quando mais precisava.

RESUMO

Objetivo: Estudo *in vitro* sobre a zircónia estabilizada com ítria, impressa em 3D (3YSZ), de forma a investigar adesão, viabilidade, proliferação e resposta osteogénica dos osteoblastos MG-63, quando comparada com o titânio.

Materiais e métodos: No nosso estudo avaliámos a morfologia de superfície dos materiais através de imagens obtidas por SEM. A adesão e a viabilidade celular foram avaliadas aos 30m, 2h e 4h, através de análise no microscópio invertido. A quantificação da adesão às 24h efetuou-se pelo teste MTT. A proliferação celular foi também avaliada pelo teste MTT ao 1º, 3º e 7º dia. Para a determinação da resposta osteogénica determinou-se quantitativamente o fosfato de cálcio presente nas amostras ao 7º e 14º dia. A análise de resultados foi feita pelo teste de *t-Student* e Mann-Whitney, considerando os valores de $p < 0,05$ significativos.

Resultados: Na adesão celular aos 30m, 2h e 4h o número de células aderidas a 3YSZ foi superior ao titânio. O titânio apresentou um valor de células aderidas superior ao 3YSZ às 24h. A viabilidade celular em 3YSZ foi similar ou superior ao titânio. Do 3º para o 7º dia verificou-se um aumento muito significativo na proliferação celular no material 3YSZ. Os níveis de cálcio ao 7º dia para a 3YSZ e titânio, foram de $62,1 \mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ e $6,96 \mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ e ao 14º dia foram de $130,7 \mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ e $64,9 \mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$, respetivamente ($p < 0,001$). Os níveis de fosfato ao 7º dia para a 3YSZ e titânio, foram de $81,2 \mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ e $4,9 \mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ e no 14º dia foram de $51,1 \mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ e $4,1 \mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$, respetivamente ($p < 0,01$).

Conclusão: O estudo mostrou que os osteoblastos aderem, proliferam e mineralizam nas superfícies de 3YSZ, sugerindo que o material cerâmico poderá apresentar boa biocompatibilidade e osteointegração. Os resultados obtidos são promissores para uma futura aplicação de 3YSZ, no âmbito da implantologia, em doentes.

Palavras-chave: zircónia; ítria; impressão 3D; osteointegração

ABSTRACT

Purpose: *In vitro* study of adhesion, viability, proliferation and osteogenic response of MG-63 osteoblasts in contact with yttria-stabilized zirconia (3YSZ), printed in 3D, comparing with titanium.

Materials and methods: In our study, we evaluated the surface morphology of the materials through images obtained by SEM. Adhesion and cell viability were evaluated at 30m, 2h and 4h, by inverted microscope analysis. The quantification of the 24h adhesion was performed through the MTT test. Cell proliferation was also evaluated by the MTT test on the 1st, 3rd and 7th days. To determine the osteogenic response, the calcium phosphate present in the samples was determined quantitatively at day 7 and day 14. The results were analysed using Student's t-test and Mann-Whitney test, considering significant values of $p < 0,05$.

Results: In the cell adhesion test at 30m, 2h and 4h the number of cells adhered to 3YSZ was higher than titanium. The titanium presented a value of adhered cells superior to 3YSZ at 24h. Cell viability in 3YSZ was similar or greater than titanium. From the 3rd to the 7th day there was a significant increase in cell proliferation. The levels of calcium at day 7 for 3YSZ and titanium were 62,1 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ and 6,96 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ and at day 14 were 130,7 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ and 64,9 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$, respectively ($p < 0.001$). The levels of phosphate at day 7 for 3YSZ and titanium were 81.2 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ and 4.9 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ and on day 14 were 51.1 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ and 4.1 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$, respectively ($p < 0.01$).

Conclusions: The study showed that osteoblasts are capable of adhering, proliferating and mineralizing on the surfaces of 3YSZ, suggesting that the ceramic material may have good biocompatibility and osseointegration. The results obtained are promising for a future application of 3YSZ in patients.

Keywords: yttria doped zirconia, 3D printing, osseointegration

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Desafios da Implantologia.....	11
1.2	Osteointegração	12
1.2.1	Mecanismos celulares durante a osteointegração	13
1.3	Materiais utilizados em implantes	16
1.3.1	Titânio e ligas de titânio – O reconhecimento da necessidade de materiais alternativos	16
1.3.2	Zircónia	17
1.3.2.1	Degradação a baixa temperatura.....	19
1.3.2.2	Tipos de cerâmicas de zircónia disponíveis para aplicações dentárias.....	20
1.3.2.2.1	Zircónia parcialmente estabilizada com magnésio.....	20
1.3.2.2.2	Zircónia reforçada com alumina.....	21
1.3.2.2.3	Zircónia estabilizada com ítria	21
1.3.2.2.3.1	O pó da zircónia estabilizada com ítria 3 mol % impressa em 3D	22
1.3.2.2.4	Estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de implantes de zircónia	23
1.4	A nova realidade - Impressão em 3D	27
1.4.1	Produção de implantes em 3D – testes <i>in vitro</i>	29
2	OBJETIVOS	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1	Tipo de estudo	33
3.2	Local de realização do estudo.....	33
3.3	Amostra estudada	33
3.4	Preparação das amostras.....	34
3.5	Análise por microscopia eletrónica de varrimento	34
3.6	Preparação da cultura celular	35
3.7	Adesão celular	36
3.8	Proliferação celular.....	38
3.9	Biomíneralização	38
3.10	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS	41

4.1	Análise por microscopia eletrônica de varrimento	41
4.2	Adesão celular	42
4.3	Proliferação celular.....	46
4.4	Biomíneralização	46
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO.....	55
7	BIBLIOGRAFIA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - a) Representação de uma tomografia computadorizada de um crânio exibindo um defeito ósseo; b) reconstrução do <i>scaffold</i> pela deposição controlada de camada a camada usando a técnica da impressão a 3D; c) defeito ósseo visualizado noutra perspetiva; d) aplicação do implante feito sob medida, demonstrado pelas setas (Velasco, 2008).....	12
Figura 2 - Imagem obtida por microscopia eletrónica de varrimento de uma célula osteoblástica aderida ao osso (Gschmeissner,S., consultado no <i>site</i> Sciencephoto, 23/10/2017).....	14
Figura 3 - Interações na superfície de um implante (consultado no site Scientific Biolin, 21/9/2017).....	15
Figura 4 - Mudança de fases da estrutura cristalina da zircónia com o aumento da temperatura (Gautam, Joyner, Gautam, Rao, & Vajtai, 2016).	19
Figura 5 - Representação das características micro-estruturais das três principais categorias de zircónia: a) imagem de TEM da fase tetragonal precipitada em Mg-PSZ; b) imagem de SEM de Y-TZP e c) imagem de SEM de ZTA (Hannink, Kelly, & Muddle, 2000).	21
Figura 6 - Representação de um implante <i>standard</i> tendo em conta o osso disponível (consultado no site BioImplant, 27/9/2017).	28
Figura 7 - Simulação através de um modelo tridimensional de um defeito ósseo na mandíbula, a) representação artificial em 3D do osso no modelo, b) simulação do osso artificial com base na TAC, c) imagem macroscópica do osso artificial impresso em 3D (Saijo et al., 2009).	28
Figura 8 - <i>Designs</i> de a) implante 3D-CAD e b) implante impresso em 3D (Osman et al., 2017).....	30
Figura 9 - Impressão em 3D de um cilindro do material 3YSZ, produzido pelo o departamento de Ciências dos Materiais da FCT.	33
Figura 10 - Amostras de titânio (esquerda) e 3YSZ (centro e direita).	34
Figura 11 - Imagem macroscópica da superfície da amostra de 3YSZ.	34

Figura 12 - a) Morfologia das células osteoblásticas em meio completo de DMEM, aderidas ao poliestireno do frasco de cultura; b) Morfologia das células osteoblásticas, quando estão submersas em tripsina. Observação a fresco em microscópio invertido x10.....	36
Figura 13 - Representação esquemática, numa visualização lateral da placa de um poço com uma amostra e meio de cultura. Demonstra os locais principais de onde as células são removidas e depois quantificadas.....	37
Figura 14 - Placas de 6 poços com as amostras a) 3YSZ e b) titânio imersas na suspensão contendo os osteoblastos células MG-63.....	37
Figura 15 - Microestrutura da amostra a) 3YSZ e b) titânio, determinada por microscopia eletrónica de varrimento.	41
Figura 16 - Progresso da adesão celular na superfície a) controlo, b) 3YSZ e c) titânio aos 30m, 2h e 4h.	43
Figura 17 - Relação entre a absorvância e o número de células do Teste de MTT realizada com as células MG-63 osteoblastos.	45
Figura 18 - Adesão dos osteoblastos MG-63 às 24h nas amostras de 3YSZ, de titânio (Ti) e no controlo. Os valores correspondem a médias \pm DP (n=5), *p=0,032.....	45
Figura 19 - Análise da proliferação celular (MG-63 osteoblastos) nas amostras de 3YSZ e no controlo ao 1º, 3º e 7º dia. Os valores correspondem a médias \pm DP (n=5), *p=0,001, ** p=0,001 e ***p=0,022.....	46
Figura 20 - Evolução da produção de Ca^{2+} pelas células MG-63 com o tempo nas amostras de 3YSZ e titânio (Ti). Os valores correspondem a médias \pm DP (n=5), *p<0,001 e **p<0,001.....	48
Figura 21 - Evolução da produção de PO_4^{2-} pelas células MG-63 com o tempo nas amostras de 3YSZ e titânio (Ti). Os valores correspondem a médias \pm DP (n=5), *p<0,001 e **p<0,001.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Análise química do pó de zircónia estabilizada com ítria 3 mol % (3YSZ) (consultado no site Innovnano, 25/9/2017).	22
Tabela 2 - Propriedades mecânicas do pó de zircónia estabilizada com ítria 3 mol % após sinterização (3YSZ) (consultado no site Innovnano, 25/9/2017).	22
Tabela 3 - Comparação entre as características do titânio grau I, Y-TZP e 3YSZ. Tabela adaptada (Bollen, 2017).	24
Tabela 4 - Comparação da biocompatibilidade entre o titânio e a zircónia (Bollen, 2017).	25
Tabela 5 - Resultados obtidos da pesquisa bibliográfica de investigações in vitro e in vivo da zircónia.	26
Tabela 6 - Viabilidade em percentagem das células MG-63 em contacto com o material 3YSZ e titânio, aos 30m, 2h e 4h.	44

LISTA DE SIGLAS

Al₂O₃ Óxido de alumínio
ANOVA Análise de variância
BIC *Contact bone-implant* (contacto ósseo-implante)
CaCl₂ Cloreto de cálcio
CaO Óxido de cálcio
Ca²⁺ Cálcio
CAD *Computer aided design* (Desenho auxiliado por computador)
CAM *Computer aided manufacturing* (Manufatura auxiliada por computador)
CO₂ Dióxido de carbono
CeO₂ Óxido de cério
Ce-TZP Zircónia estabilizada com cério
c-ZrO₂ Zircónia fase cúbica
DMEM *Dulbeco's Modified Eagle Medium*
DLP *Digital light processing technique* (Técnica de processamento de luz digital)
DP Desvio Padrão
Fe₂O₃ Óxido de ferro
HfO₂ Óxido de háfnio
La₂O₃ Óxido de lantânio
LTD *Degradation at low temperature* (Degradação a baixa temperatura)
JNK c-Jun NH₂-terminal quinase
MgO Óxido de magnésio
MAPK Proteína-quinase ativada por mitógeno
Mg-PSZ Zircónia parcialmente estabilizada com óxido de magnésio
MTT Teste de viabilidade celular
NaH₂PO₄ (di)hidrogenofosfato
PBS *Phosphate buffered saline* (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PO₄³⁻ Fosfato
PSZ Zircónia parcialmente estabilizada
SLA *Sandblasted, large grit, acid etched*
SEM *Scanning Electron Microscopy* (Microscópio eletrónico de varrimento)
SiO₂ Dióxido de silício

TBS *Tris-buffered saline* (Solução salina tamponada com Tris)
TCA Ácido tricloroacético
TEM *Transmission electron microscopy* (Microscópio eletrónico de transmissão)
TZP Zircónia tetragonal policristalina
Y₂O₃ Óxido de ítrio
ZrSiO₄ Silicato de zircónio
ZrO₂ Zircónia
ZTA Zircónia reforçada com alumina
Y-PSZ Zircónia parcialmente estabilizada com ítria
Y-TZP Zircónia policristalina tetragonal estabilizada com ítria
3YSZ Zircónia estabilizada com ítria impressa em 3D
3Y-TZP Zircónia estabilizada com ítria com 3% mol de ítria
3D Três dimensões

Símbolos

% Percentagem
 µm Micrómetro
 °C Graus celsius
 cm² Centímetro quadrado
 c---t Fase cúbica para fase tetragonal
 h Horas
 HV Número Vickers
 g/cm³ Densidade
 M mol
 MPa Megapascal
 m Minutos
 mL Mililitro
 Mm Milímetro
 mM Milimolar
 nm Nanómetro
 pH Potencial de hidrogénio
 s Segundos
 rpm Rotação por minuto
 t---m Fase tetragonal para fase monoclinica
 t-Zr Fase tetragonal da zircónia
6AL-4V ELI Liga de 6% de alumínio e 4% de vanádio

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desafios da Implantologia

Existe uma grande necessidade clínica de descobrir as melhores técnicas para substituir, restaurar ou regenerar o tecido ósseo e os tecidos dentários (Brydone, Meek, & Maclaine, 2010).

Atualmente, quando nos deparamos com situações de defeitos ósseos decorrentes de traumas, acidentes, tumores, infecções ou doenças ósseas, verificamos que a substituição, restauração ou regeneração do osso e a substituição de dentes perdidos, representam difíceis desafios clínicos. Com vista ao seu tratamento, tem vindo a ser desenvolvido, desde os anos 70, diversos materiais cerâmicos para a substituição de partes do corpo humano destruídas ou sem função (Figura 1) (Brydone *et al.*, 2010; Hadjicharalambous, Mygdali, *et al.*, 2015).

Nesse sentido, a zircónia tem-se destacado pelas semelhanças com o tecido ósseo, pelo bom desempenho funcional e estético, pela resistência mecânica e biocompatibilidade. Na reparação do osso e na reabilitação dentária, podem ser usados vários biomateriais, sendo um deles a zircónia (Hochscheidt, Alves, Bernardes, & Hochscheidt, 2011).

Presentemente, os padrões de implantes comercialmente disponíveis proporcionam opções de *design* limitadas em relação ao comprimento, diâmetro e parâmetros de rosca. Devido à grande variedade de condições orais e situações clínicas individuais, os implantes personalizados têm a capacidade de colmatar esses padrões disponíveis e proporcionar uma condição individual para cada tipo de doentes (Osman, van der Veen, Huiberts, Wismeijer, & Alharbi, 2017).

Uma das principais dificuldades na área da implantologia, independente do material utilizado é a garantia do sucesso da osteointegração.

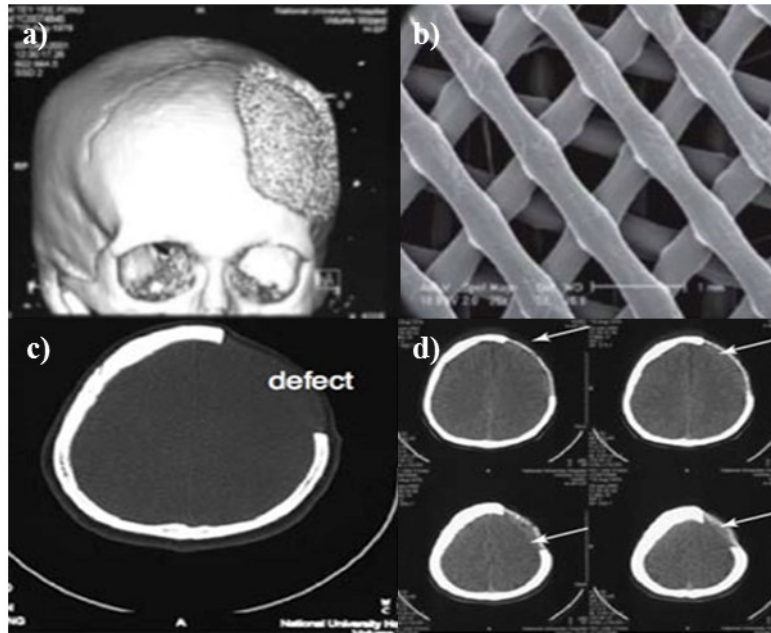


Figura 1 - a) Representação de uma tomografia computadorizada de um crânio exibindo um defeito ósseo; b) reconstrução do *scaffold* pela deposição controlada de camada a camada usando a técnica da impressão a 3D; c) defeito ósseo visualizado noutra perspectiva; d) aplicação do implante feito sob medida, demonstrado pelas setas (Velasco, 2008).

1.2 Osteointegração

Para o desenvolvimento de materiais clinicamente eficazes, que possam ser utilizados numa reconstrução óssea ou implantados no osso, é necessário compreender a capacidade que os osteoblastos possuem para responder aos diferentes materiais e os mecanismos relacionados com osteointegração (Hadjicharalambous, Mygdali, *et al.*, 2015).

Na produção de um material para colocação óssea é fulcral que se assegure que a superfície do material garanta uma resposta específica e ideal das células alvo, não sendo apenas relevante que o mesmo apresente boas condições no que respeita à sua dureza e resistência (Chappuis *et al.*, 2015).

Para se lograr essa desejada resposta das células alvo, é necessário ter especial atenção no que concerne às propriedades químicas, físicas e mecânicas do material utilizado, uma vez que as mesmas vão ter influência no que respeita à adesão, morfologia, proliferação e diferenciação das células ósseas e na formação da matriz extracelular, sendo importante que os mesmos apresentem boas propriedades biológicas e mecânicas para facilitar a regeneração óssea. Sendo que a capacidade que esse material tem para despoletar a osteointegração é a característica mais importante no desenvolvimento de um material para implantação óssea (Gebran & Wassal, 2007; Hadjicharalambous, Mygdali, *et al.*, 2015).

No caso específico da interação osso-implante, a interface entre ambos deve permitir que, durante o processo de osteointegração, haja a síntese de matriz óssea pelos osteoblastos e consequentemente a formação de novo osso em redor de toda a superfície do mesmo (Altmann *et al.*, 2016).

Adicionalmente a topografia da superfície afeta as interações entre as moléculas presentes na superfície e as células. Neste sentido, vários autores demonstram o possível uso de fatores de crescimento e moléculas da matriz para aumentar e melhorar a formação de novo osso (Gebran & Wassal, 2007).

Para além dos aspetos referidos, o material não deve provocar nenhuma resposta anormal (quer local ou sistémica), e não deve sofrer degradação quando exposto aos fluídos e tecidos circundantes (Felgueiras, 2011).

O sucesso na osteointegração implica uma ótima adesão celular, para que se obtenha a proliferação e posteriormente a diferenciação das células ósseas (Bergemann *et al.*, 2015). Desta forma para que o processo de osteointegração decorra com sucesso ter-se-á que verificar todos os mecanismos celulares decorrentes do mesmo.

1.2.1 Mecanismos celulares durante a osteointegração

Os mecanismos envolvidos durante a osteointegração aquando da inserção de um implante são caracterizados por três fases, a saber: *i)* fase inflamatória; *ii)* fase proliferativa; *iii)* fase de maturação (Vaidya, Mahale, Kale, & Patil, 2017).

A fase inflamatória caracteriza-se pela formação de um coágulo sanguíneo, após o preparo do leito cirúrgico e instalação do implante, resultante do encontro das plaquetas com uma superfície sintética. As mesmas vão libertar serotonina e histamina originando maior agregação plaquetária (Vaidya *et al.*, 2017).

Durante a fase proliferativa, surge uma neovascularização nos tecidos vitais circundantes, no qual o metabolismo das células inflamatórias locais e as células progenitoras vão criar uma área de hipoxia, que vai despoletar a diferenciação das células mesenquimais em fibroblastos, osteoblastos e condroblastos (Vaidya *et al.*, 2017).

O primeiro contacto entre o substrato e as células é denominado por adesão celular (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). A adesão celular define-se como a capacidade que uma única célula tem para se conectar a outra célula ou a uma matriz extracelular. Para a sobrevivência dos fibroblastos e osteoblastos, células dependentes da “ancoragem”, os mesmos necessitam de estabelecer a adesão, o que, tal como referido *supra*, reforça a

ideia de que as características da superfície do material constituem um elemento chave para o controlo de um resultado com sucesso (Sagvolden, Giaever, Pettersen, & Feder, 1999).

A forma como as células se ligam à matriz de suporte vai determinar o destino destas no que respeita à proliferação, à manutenção da função celular e à integridade do tecido ósseo (Haj, Wood, Thomas, & Yang, 2005; Khalili & Ahmad, 2015).

A adesão dos osteoblastos à superfície do biomaterial realiza-se através de adesões focais. As adesões focais funcionam como elos estruturais entre o citoesqueleto e a matriz extracelular, permitindo que a célula se adapte à superfície do material. Este tipo de adesão ativa vias de sinalização, como a MAPK e JNK, as quais, em combinação com os recetores do fator de crescimento, regulam a atividade do fator de transcrição, direcionando o crescimento e a diferenciação celular (Felgueiras, 2011; García & Reyes, 2005; Giancotti & Ruoslahti, 1999).

Os osteoblastos são células derivadas de células-tronco mesenquimais pluripotenciais, as quais têm a capacidade para se diferenciar em várias linhagens. Estas células têm a capacidade de sintetizar a matriz extracelular e controlar a sua mineralização, assumindo, relacionado com outros fatores, um papel determinante no sucesso ou insucesso da interface entre osso-implante (Figura 2) (Baxter, Frauchiger, Textor, Gwynn, & Richards, 2002; Davies, 1996).

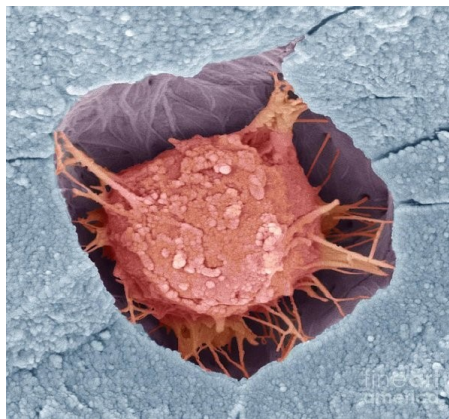


Figura 2 - Imagem obtida por microscopia eletrônica de varrimento de uma célula osteoblástica aderida ao osso (Gschmeissner, S., consultado no *site* Sciencephoto, 23/10/2017).

Durante a adesão celular, verificam-se vários acontecimentos que surgem quando uma superfície de um substrato é envolvida por um biofluido, quer seja sangue *in vivo* ou de um meio contendo células *in vitro* (Kasemo & Gold, 1999).

Após a colocação de um biomaterial no osso, este entra em contacto com o sangue surgindo, de imediato, a hidratação da superfície com moléculas de água. Nesse momento, por um lado, forma-se uma camada de moléculas de água hidrofílica que incorpora os iões cloro, sódio e cálcio, como iões hidratados e, por outro, as proteínas do sangue que também se adsorvem à superfície do implante. Deste modo, quando as células atingem a interface com o material, deparam-se com um revestimento iónico e proteico para a sua ligação, que foi determinado pelas propriedades iniciais do material (Figura 3) (Felgueiras, 2011; Hosseini *et al.*, 2015).

Com efeito, as células vão-se ligar indiretamente a um substrato, sendo esta ligação um elemento chave para determinar o tipo de tecido que cresce ao redor da superfície do material, por exemplo, se irá ser tecido fibroso ou tecido ósseo maduro. Para a adesão celular se completar com eficácia, posteriormente todo este processo tem de permitir eventos celulares tais como a proliferação e diferenciação em células maduras sobre a superfície do material, que, idealmente, deverá iniciar-se de imediato e, cuja duração, deverá ocorrer no mais curto espaço de tempo possível (Hosseini, Kazemian, & Ghorbanzadeh, 2015; Kasemo & Gold, 1999).

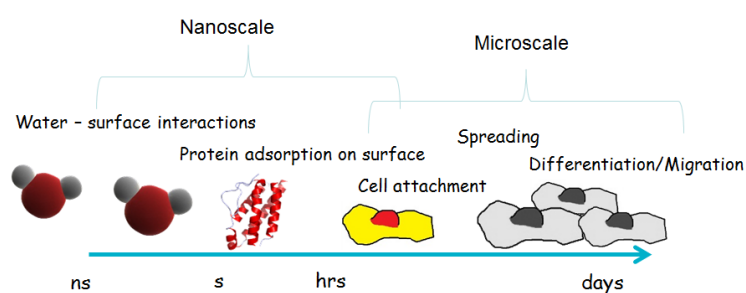


Figura 3 - Interações na superfície de um implante (consultado no *site* Scientific Biolin, 21/9/2017).

Após a diferenciação dos osteoblastos em células maduras secretoras, estas aderem à superfície do implante para produzir fibras de colagénio e proteínas, no qual se forma uma fina camada de matriz óssea. Seguindo-se a deposição de iões de cálcio e fosfato na matriz orgânica, que contém também proteínas ósseas não colagenosas e proteoglicanas, formando o osso imaturo. A precipitação de iões de cálcio é o passo mais crucial,

iniciando-se a nucleação para a formação da hidroxiapatite. A deposição de cálcio é seguida pela chegada de fosfato, dando origem ao fosfato de cálcio. Nesta altura, acredita-se que surge uma apatite semelhante à do osso nas superfícies dos materiais implantados, sítio onde mais tarde vai cristalizar a estrutura de hidroxiapatite (Liu, Huang, Ding, & Chu, 2006).

Na fase da maturação ocorre, como o nome indica, o amadurecimento da matriz, com formação dos cristais de hidroxiapatite. Após alguns dias, o osso imaturo e osso trabecular reparador surgem no espaço criado aquando a inserção do implante, ou seja, entre o implante e o tecido ósseo. O osso trabecular vai sendo progressivamente substituído por osso lamelar maduro, através de processos dinâmicos da osteogénese e reabsorção óssea (Hosseini *et al.*, 2015; Vaidya *et al.*, 2017; Wróbel, Witkowska-Zimny, & Przybylski, 2010).

1.3 Materiais utilizados em implantes

1.3.1 Titânio e ligas de titânio – O reconhecimento da necessidade de materiais alternativos

O titânio e as ligas de titânio são dos materiais mais utilizados para implantação óssea. Em Medicina Dentária, são frequentemente utilizados sob a forma de implantes para substituição de dentes perdidos, ou como ancoragem para ortodontia (Özkurt & Kazazoglu, 2011).

Utilizado há várias décadas, tem sido entendido que o titânio puro e as ligas de titânio são uma boa opção no que respeita à sua aplicação no âmbito da implantação óssea (S. Han *et al.*, 2011; Steinemann, 1998).

Todavia, também se verificam desvantagens na utilização de titânio ao nível ósseo. Este material apresenta a possibilidade de provocar reações de hipersensibilidade ou inflamação dos tecidos circundantes. Estas reações devem-se a certas substâncias como fluoreto e peróxido de hidrogénio ou pela corrosão da superfície do titânio na cavidade oral (Nair *et al.*, 2015).

Acresce que, da aplicação destes materiais para a implantação óssea, resulta a disseminação de titânio, alumínio ou vanádio para a corrente sanguínea, resultando em citotoxicidade e em reações mutagénicas e carcinogénicas (J. J. Wang, Sanderson, & Wang, 2007).

Em relação à utilização de titânio para substituição de dentes, em situações de inflamação tecidual pode levar à perda óssea alveolar e consequente recessão gengival, com a revelação da porção metálica do implante. O biótipo gengival fino e a linha do sorriso alta constituem um desafio para a utilização deste material, pois é frequentemente visível a cor escura acinzentada do titânio (C.-T. Lee, Huang, Zhu, & Weltman, 2017; Nair *et al.*, 2015; Özkurt & Kazazoğlu, 2011).

Com efeito, afigura-se que, as referidas desvantagens da aplicação do titânio na implantologia, com destaque para a hipersensibilidade, a corrosão do titânio através da degradação gradual do material, a sua disseminação para a corrente sanguínea e o fator estético, representam verdadeiros elementos encorajadores para a pesquisa de materiais alternativos ao mesmo, o que consubstanciou um importante fator motivacional para a presente investigação.

Nesse sentido, os novos materiais, como cerâmicas biocompatíveis e substratos de vidro bioativo, com uma cor semelhante aos dentes naturais, são considerados como excelentes candidatos a materiais alternativos ao uso de titânio na implantologia (Y. Cho *et al.*, 2015).

1.3.2 Zircónia

Há cerca de 30 a 40 anos foram introduzidos regularmente na prática clínica os materiais cerâmicos, os quais, nos últimos 10 anos, tem vindo a ganhar destaque no âmbito da implantologia (Buser, Sennerby, & Bruyn, 2017; Osman, Swain, Atieh, Ma, & Duncan, 2014).

O dióxido de zircónio foi descoberto originalmente pelo o químico alemão Martin Heinrich Klaproth (1743-1817) em 1787 em Berlim, extraído do mineral zircão (silicato de zircónio, $ZrSiO_4$). Zircão já é conhecido há muito tempo, tendo o seu nome, origem numa palavra árabe “*zargun*” que tem como significado “cor dourada”. O zircónio nunca é descoberto na natureza como um metal nativo, apenas pode ser obtido principalmente através do mineral zircão. O processo atual para se obter o zircónio é a partir da aglomeração das águas costeiras, desta forma o mineral sólido zircão é purificado através de concentradores para remover o excesso de areia e cascalho, de seguida passa por separadores magnéticos para remover ilmenite e rutilo. O zircão refinado é o primeiro mineral a ser purificado em zircónio puro, através de cloro ou outros agentes, de seguida é sinterizado até ser suficientemente dúctil para ser trabalhado. Martin

Heinrich Klaproth em 1789 através do aquecimento de algumas gemas, obteve como produto da reação, a zircónia (ZrO_2). A zircónia provém do zircónio e é um óxido branco cristalino (Ali, Karthigeyan, Deivanai, & Mani, 2014; Assal, 2013; Hisbergues, Vendeville, & Vendeville, 2008).

Este material já é utilizado há mais de duas décadas pelos médicos dentistas, principalmente, em coroas e pontes, tendo-se verificado um crescente interesse na sua utilização como material para implantação óssea (J. Han *et al.*, 2016).

Em situações de colocação de implantes de zircónia, a inflamação e a reabsorção óssea induzida pelas partículas de cerâmicas são menores do que as induzidas por partículas de titânio, sendo considerado por alguns autores como o material cerâmico que apresenta melhor biocompatibilidade (Cho *et al.*, 2015; Özkurt & Kazazoğlu, 2011). De acordo com as pesquisas de Nair *et al.* (2015) as cerâmicas de zircónia não provocam reações inflamatórias, alérgicas, imunológicas, tóxicas, mutagénicas ou carcinogénicas nos tecidos conjuntivos, ou ósseos (Nair *et al.*, 2015).

A zircónia é considerada um material quimicamente inerte e osteocondutor. É um material inerte uma vez que não se liga ao osso por interação bioquímica, mas simplesmente por meio de fixação morfológica. A osteocondução consiste na capacidade de o material servir como um *scaffold* para as células e os vasos capilares, o que proporciona uma excelente interação com os osteoblastos, criando assim condições para a formação da matriz óssea (Y. Cho *et al.*, 2015; Martin & Bettencourt, 2017; Montazerian & Zanotto, 2016; Nair *et al.*, 2015).

A zircónia pura existe em três formas cristalinas: monoclinica, cúbica e tetragonal. Como explicado na Figura 4, encontra-se na forma monoclinica (estável) até cerca de 1170°C, tetragonal de 1170°C até 2370°C e cúbica de 2680°C até à temperatura de fusão (2680°C). A fase tetragonal transforma-se na fase monoclinica no momento do resfriamento por meio de transformação martensítica, que consequentemente pode fraturar um corpo sinterizado. Desta forma existe a necessidade de adicionar estabilizadores nomeadamente CaO, MgO, Y_2O_3 , CeO_2 que estabilizam as fases de alta temperatura (tetragonal e cúbica) (Ali *et al.*, 2014; Gautam, Joyner, Gautam, Rao, & Vajtai, 2016; Yoshimura, Molisani, Narita, Gonçalves, & Campos, 2007).

A zircónia estabilizada mantém-se na fase tetragonal até à temperatura ambiente ou inferior, exibindo, desta forma, propriedades mecânicas superiores em relação à zircónia pura, tornando-a vantajosa para as aplicações na ortopedia (Piconi & Maccauro, 1999).

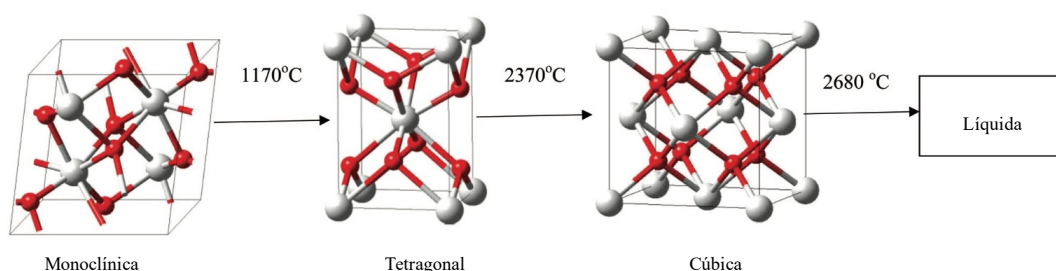


Figura 4 - Mudança de fases da estrutura cristalina da zircônia com o aumento da temperatura (Gautam, Joyner, Gautam, Rao, & Vajtai, 2016).

Neste sentido, Heuer *et al.* (1986) corroboram estes resultados ao demonstrar que a zircônia estabilizada apresenta melhores características em comparação com a zircônia pura (Heuer, Lange, Swain, & Evans, 1986).

Na literatura a zircônia é apresentada como um material suficientemente biocompatível e mecanicamente resistente para ser utilizado na área da implantologia (Bergemann *et al.*, 2015). A zircônia possui boas características físicas, com destaque para o valor da dureza 1200 HV 0,1, a alta resistência à flexão de 900-1200 MPa, o módulo de Weibull de 10-12, a resistência à fratura de 8 MPa \sqrt{m} e o baixo poder de corrosão (Qahtani *et al.*, 2016). Contudo, este material apresenta como desvantagem a sua degradação a baixa temperatura.

1.3.2.1 Degradação a baixa temperatura

Apesar das qualidades mecânicas das cerâmicas de zircônia, há desvantagens, como a possibilidade de existirem alterações na superfície do material. Este tipo de material submetido a temperaturas baixas e a ambientes húmidos pode sofrer transformação da fase tetragonal para a fase monoclinica (Tabari, Ansari, Siavashani, & Eskandarion, 2014). Este fenómeno, conhecido como a degradação a baixa temperatura (LTD), leva à mudança de fases, esta tem início na transformação de um grão que é acompanhada pelo aumento de volume e que vai induzir tensões nos grãos circundantes. Isso vai levar a microfissuras que permitem a entrada de água para o interior do material, permitindo que a transformação avance em todo o material e origine pequenas fendas e diminuição da resistência. Embora a LTD reduza as características mecânicas da zircônia essa redução cai em valores clinicamente aceitáveis (Ali *et al.*, 2014).

Com efeito, afigura-se ser necessário desenvolver um material que tenha maior resistência, tenacidade, melhor performance para resistir à fadiga, e maior capacidade de resistir à temperatura e consequente degradação (J. Han *et al.*, 2016 ; Tabari *et al.*, 2014).

De acordo com Gremillard e Chevalier em 2008 e Lughi e Sergo em 2010, os relatos de falhas clínicas originadas pela degradação a baixa temperatura indicam a necessidade de melhorar a estabilidade estrutural deste material (Gremillard & Chevalier, 2008;Lughi & Sergo, 2010).

Futuras pesquisas poderão descobrir novas aplicações para a zircônia, tendo este material um futuro muito promissor (Ali *et al.*, 2014).

1.3.2.2 Tipos de cerâmicas de zircônia disponíveis para aplicações dentárias

Presentemente são utilizados diversos tipos de sistemas cerâmicos que contêm zircônia, contudo apenas três têm tido aplicação no âmbito da Medicina Dentária: a zircônia parcialmente estabilizada com magnésio (Mg-PSZ), a zircônia reforçada com alumina (ZTA) e os policristais de zircônia tetragonal de ítria (3Y-TZP) (Figura 5) (Ali *et al.*, 2014).

1.3.2.2.1 Zircônia parcialmente estabilizada com magnésio

Na zircônia parcialmente estabilizada, a estabilização do material não é totalmente atingida. A estabilização compreende a adição do estabilizador MgO (8-10% mol) com concentrações inferiores às exigidas para alcançar a estabilização completa da fase cúbica da zircônia (c-ZrO₂) (Heuer, 1987;Kelly & Denry, 2008; Khamverdi & Moshiri, 2013).

A zircônia parcialmente estabilizada com magnésio, comporta-se como um aglomerado de cristais tetragonais dentro de uma matriz cúbica de zircônia (Khamverdi & Moshiri, 2013).

Não se tem verificado um recurso de referência a este material na área da implantologia devido à sua porosidade. Acresce que o grande tamanho de grão (30-60 µm), pode incitar a um desgaste do material, o que vai levar à diminuição da estabilidade e propriedades mecânicas comparativamente à zircônia estabilizada com ítria (Ali *et al.*, 2014; Khamverdi & Moshiri, 2013).

1.3.2.2.2 Zircónia reforçada com alumina

Na zircónia reforçada com alumina existe uma dispersão das partículas de zircónia que se vão combinar com uma matriz de alumina. Ao contrário das outras duas classes (i. e. zircónia estabilizada com ítria e zircónia parcialmente estabilizada com magnésio), a estabilidade da fase tetragonal à temperatura ambiente não envolve maioritariamente o uso de estabilizadores, sendo sim, controlada pelo tamanho, morfologia e localização das partículas (Ali *et al.*, 2014; Kelly & Denry, 2008).

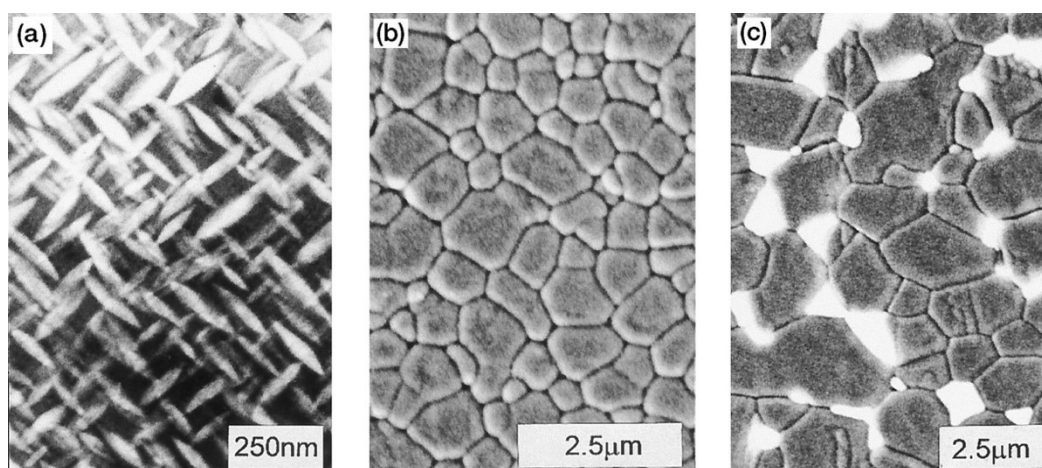


Figura 5 - Representação das características micro-estruturais das três principais categorias de zircónia: a) imagem de TEM da fase tetragonal precipitada em Mg-PSZ; b) imagem de SEM de Y-TZP e c) imagem de SEM de ZTA (Hannink, Kelly, & Muddle, 2000).

1.3.2.2.3 Zircónia estabilizada com ítria

A cerâmica de zircónia estabilizada com ítria tem sido empregue em implantes ósseos devido ao seu excecional comportamento mecânico (Hadjicharalambous, Mygdali, *et al.*, 2015).

Ao comparar a alumina com a zircónia estabilizada com ítria, esta apresenta melhores propriedades, tem uma maior resistência à flexão, um menor módulo de elasticidade e maior resistência à fratura (Kelly & Denry, 2008). A zircónia estabilizada com ítria em comparação com outras combinações de zircónia, apresenta melhores propriedades. Atualmente, este biomaterial é considerado como um dos que tem maior potencial no que respeita à sua aplicação para finalidades médicas (Y. Cho *et al.*, 2015; Manicone, Iommetti, & Raffaelli, 2007).

O aparecimento dos implantes de zircónia tetragonal estabilizada com ítria estimulou o seu uso clínico, sendo, desde o final da década de 1980, utilizada no fabrico de cabeças

femorais para substituição total da anca (Andreiotelli & Kohal, 2009; Depprich et al., 2008; Kohal, Att, Bächle, & Butz, 2008; Özkurt & Kazazoğlu, 2011).

A maioria da zircônia utilizada no âmbito da área da implantologia encontra-se na forma de zircônia tetragonal estabilizada com ítria policristalina (3Y-TZP) (J. Han *et al.*, 2016).

O 3Y-TZP é constituído por uma matriz de pequenos grãos (0,2 a 0,5 µm de diâmetro) estabilizados com a adição de 3% mol de óxido de ítria. O tamanho dos grãos depende da temperatura de sinterização (Ali *et al.*, 2014).

1.3.2.2.3.1 O pó da zircônia estabilizada com ítria 3 mol % impressa em 3D

O pó 3YSZ beneficia de propriedades químicas (Tabela 1) e físicas melhoradas (Tabela 2), pois este material após a sua sinterização exibe uma maior dureza, tem resistência à flexão e resistência ao desgaste. Este excelente desempenho permite ser aplicado em situações fisicamente exigentes (Innovnano).

Tabela 1 - Análise química do pó de zircônia estabilizada com ítria 3 mol % (3YSZ) (consultado no site Innovnano, 25/9/2017).

ZrO₂+HfO₂+ Y₂O₃+Al₂O₃ (wt.%)	>99,9
HfO₂	<3,0
Y₂O₃	5,2±0,2
Al₂O₃	0,4±0,1
SiO₂	<0,015
Fe₂O	<0,02

Tabela 2 - Propriedades mecânicas do pó de zircônia estabilizada com ítria 3 mol % após sinterização (3YSZ) (consultado no site Innovnano, 25/9/2017).

Tamanho do grão (nm)	<250
Densidade (g/cm³)	6,07
Dureza (HV10)	1350
Resistência à flexão (MPa)	1800
Resistência à fratura (HV10)(MPa.m^{0,5})	5

1.3.2.2.4 Estudos *in vitro* e *in vivo* de implantes de zircónia

A biocompatibilidade de 3Y-TZP tem vindo a ser estudada através de testes *in vitro* e *in vivo*, verificando-se a inexistência de reações adversas com células ou tecidos (Ali *et al.*, 2014).

Scarano *et al.* (2003) avaliaram a resposta óssea na colocação de implantes de zircónia após as quatro semanas da inserção, tendo alcançado uma grande quantidade de osso recém-formado na superfície da zircónia, com uma percentagem de contacto ósseo-implante de $68,4\% \pm 2,4\%$, não se tendo verificado nenhuma célula inflamada ou multinucleada. O estudo permitiu concluir que o material é biocompatível e osteocondutor (Scarano, Di Carlo, Quaranta, & Piattelli, 2003).

Mellinghoff (2006) relatou a probabilidade de sobrevivência de implantes de zircónia, e esta foi de 93%, após um ano de terem sido colocados (Mellinghoff, 2006).

Wenz *et al.* (2008), descreveram períodos de observação de osteointegração do material de Y-TZP em diferentes animais que variavam de quatro semanas a 24 meses. Em relação ao contacto ósseo-implante apresentava-se acima dos 60% em quase todos os implantes, o que demonstra sucesso na osteointegração. Em comparação com o titânio, os implantes de Y-TZP demonstraram resultados semelhantes ou superiores ao titânio (Wenz, Bartsch, Wolfart, & Kern, 2008).

Também, Hoffmann *et al.* (2008) avaliaram histologicamente o grau de aposição óssea às duas e quatro semanas em torno do material de zircónia implantado. Neste estudo verificou-se que os implantes de zircónia apresentavam um grau de aposição óssea superior, 54,80% - 55,40%, comparativamente ao titânio que apresentavam 42,80% - 52,50% às duas semanas. Contudo, às quatro semanas a aposição óssea foi maior nos implantes de titânio (68% - 91,70%) do que nos implantes de zircónia (62,20% - 80,70%) (Hoffmann, Angelov, Gallez, Jung, & Weber, 2008).

Thaleia Vagkopoulou *et al.* (2009), concluíram, através de estudos *in vitro* e *in vivo*, que a biocompatibilidade de Y-TZP era elevada. Segundo Thaleia Vagkopoulou *et al.* (2009), Y-TZP possui um grande poder de aderência celular e não desenvolve reações adversas locais ou sistémicas (Vagkopoulou, Koutayas, Koidis, & Strub, 2009).

Nevins *et al.* (2011) descreveram resultados de avaliações histológicas e clínicas de um implante de duas peças fabricadas em zircónia comparativamente com as de um implante de titânio. Estes autores observaram, na avaliação histológica do implante de zircónia, a existência de contacto ósseo-implante, o que permitiu aferir a capacidade de osteointegração do material. Adicionalmente, este material demonstrou capacidade de

cicatrização perante tecidos moles e duros (Nevins, Camelo, Nevins, Schupbach, & Kim, 2011).

Investigações *in-vivo* feitas em animais, observou-se que a biocompatibilidade e a osteointegração da Y-TZP era superior à do titânio (Bergemann *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2014).

De acordo com as pesquisas que Han *et al.* concretizaram em 2016, confirma-se que 3Y-TZP não induz ou provoca reação inflamatória. Adicionalmente, também se observa a adsorção das proteínas, o estabelecimento da ligação celular entre os osteoblastos, a proliferação e a diferenciação. Acresce ainda, que as taxas do contacto e a força de ligação ósseo-implante demonstram ser semelhantes aos implantes de titânio (J. Han *et al.*, 2016).

Strickstock *et al.* (2017) efetuaram um estudo *in vitro* e *in vivo*, no qual avaliaram Y-TZP com diferentes graus de aspereza em discos e implantes e concluíram que as células exibiam viabilidade (>95%), e os implantes revelaram um contacto ósseo-implante comparável ao titânio SLA (*sandblasted, large grit, acid etched*) (Strickstock *et al.*, 2017).

Em 2017, Curd Bollen, refere que a empresa Straumann® realizou um estudo comparativo entre o implante SLA-titânio e o implante ZLA-zircônia. Os resultados obtidos demonstraram características melhores nos implantes de zircônia (Tabela 3) (Bollen, 2017). A Tabela 3 representada é adaptada à tabela de Bollen (2017), adicionando 3YSZ de forma a comparar as suas características.

Tabela 3 - Comparação entre as características do titânio grau I, Y-TZP e 3YSZ. Tabela adaptada (Bollen, 2017).

	Titânio grau I	Y-TZP	3YSZ
Densidade	4,5 g/cm ³	6,05 g/cm ³	6,07 g/cm ³
Resistência/Dureza	250 HV	1100-1500 HV	1350 HV
Resistência à flexão/Força	680 MPa	1200 MPa	1800 MPa

Curd Bollen (2017) também afirma que zircônia é um material claramente biocompatível, uma vez que não liberta iões e não revela citotoxicidade, adicionalmente a adesão precoce e a colonização de bactérias nas superfícies de zircônia é muito menor que o titânio (Tabela 4) (Bollen, 2017).

Tabela 4 - Comparação da biocompatibilidade entre o titânio e a zircónia (Bollen, 2017).

	Titânio	Zircónia
Libertação de iões	Sim	Não
Toxicidade	Baixa	Não
Adesão de placa	Baixa	Muito baixa

Em 2017, foi realizada uma meta-análise por A. Hafezeqoran e R. Koodaryan, em que a síntese dos dados mostrou valores de contacto ósseo-implante significativamente melhores nos implantes de zircónia com tratamento *acid etch* na superfície superfície em comparação com implantes de titânio, e valores superiores em implantes de zircónia com superfícies não modificadas comparando com implantes de zircónia com superfície modificada (Hafezeqoran & Koodaryan, 2017).

Tabela 5 - Resultados obtidos da pesquisa bibliográfica de investigações *in vitro* e *in vivo* da zircónia.

Autores	Material estudado	Tipo de investigação	Grupo controlo	Tratamento de superfície	Tempo de observação	Observações	Conclusões
Scarano <i>et al.</i> (2003)	Zircónia	Animal	Não	Não	4 semanas	Reação inflamatória e a cicatrização óssea	BIC de 68%; sem inflamação e biocompatibilidade da zircónia
Mellinghoff (2006)	5% Y-TZP	Humano	Não	Não	1 ano	Probabilidade sobrevivência	Sobreviveram 93% dos implantes colocados
Wenz <i>et al.</i> (2008)	Y-TZP	Revisão de literatura					Não pode ser recomendado para uso clínico de rotina
Hoffmann <i>et al.</i> (2008)	Zircónia	Animal	Titânio	Zr: áspera Ti: <i>sandblasted, acid etched</i>	2 a 4 semanas	Aposição óssea mais cedo ao redor da zircónia	Aposição óssea semelhante ao redor de implantes de zircónia e em implantes de titânio
Nevins <i>et al.</i> (2009)	Zircónia	Humano	Titânio	Não	6 meses	Cicatrização óssea e dos tecidos moles em torno do implante	Demonstrou osteointegração, capacidade de cicatrização de tecidos moles e duros, e biocompatibilidade
Strickstroock <i>et al.</i> (2017)	Y-TZP	<i>In vitro</i> e animal	Titânio SLA	Zr: <i>sandblasted</i> Ti: <i>sandblasted, large grit, acid etched</i>	7 dias 4 meses	Comportamento celular e aposição óssea ao redor do implante	Viabilidade > 95%, contato ósseo-implante comparável ao titânio SLA
Osman <i>et al.</i> (2017)	3-YSZ	<i>In vitro</i>				Propriedades mecânicas e precisão dimensional de um implante impresso em 3D em zircónia	DLP é eficiente para a impressão de implantes de zircónia. Forças de resistência à flexão próximas das cerâmicas produzidas convencionalmente

Para se desenvolverem implantes inovadores, tendo em vista o sucesso numa aplicação clínica, é fundamental que exista um foco na composição química e no tipo de superfície para se poder originar uma resposta adequada dos tecidos. Para se conseguir alcançar os melhores implantes para aplicações clínicas, os estudos *in vitro* têm demonstrado ser um instrumento indispensável. Com intuito de investigar a química e a relação da superfície dos implantes com os tecidos moles, será necessário o estudo inicial dos sistemas celulares *in vitro*. Os testes *in vitro* resultam em conclusões sobre a reação que o material vai gerar, sendo inicialmente também uma forma de economizar recursos (Altmann *et al.*, 2016).

Todavia, para que um implante possa ser recomendado para uso clínico, as investigações em animais e em ensaios clínicos devem ser executados com um acompanhamento a longo prazo, por forma a perceber se os resultados se traduzem num sucesso clínico (Gungor, Aydın, Yılmaz, & Gul, 2014).

Desta forma, ainda se afigura ser relativamente desconhecido, se os implantes de zircónia poderão tornar-se num material alternativo que possa ser utilizado na implantologia como substituto válido (a longo prazo) do titânio (Buser *et al.*, 2017).

1.4 A nova realidade - Impressão em 3D

Com o rápido avanço tecnológico dos biomateriais de implantes e da tecnologia CAD/CAM (desenho guiado por computador / fabricação guiada por computador) surgiu o interesse na realização de implantes personalizados para combater a incongruência entre a geometria do implante convencional e o osso disponível. A impressão em 3D veio permitir a personalização, produzindo um implante com qualquer geometria (Figura 6) (Chen *et al.*, 2014).

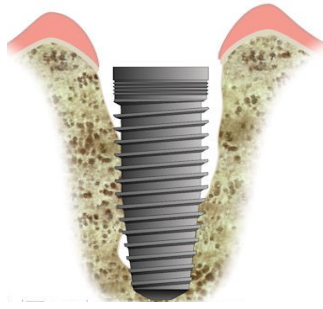


Figura 6 - Representação de um implante *standard* tendo em conta o osso disponível (consultado no site BioImplant, 27/9/2017).

A técnica mais utilizada para fabricar peças em zircónia consiste no fresamento. Porém, este processo de fabricação tem alguns inconvenientes, nomeadamente a necessidade de quantidades substanciais de matéria-prima, e o seu consequente desperdício, precisão limitada e o facto de ser um processo demorado. No entanto, a impressão em 3D de cerâmicas avançadas apresenta a vantagem de permitir a prototipagem rápida e, assim, competir com as técnicas de fresagem normalmente utilizadas para fabricar peças em zircónia (Anssari Moin, Hassan, & Wismeijer, 2016).

Existem vários processos de impressão que estão a ser testados em combinação com diferentes biomateriais para a impressão em 3D de peças específicas para cada doente. Esta técnica de impressão pode facilitar a reabilitação, em situações de reabilitação protética ou cirúrgica em doentes comprometidos sob ponto de vista maxilo-facial (Figura 7) (Anssari Moin *et al.*, 2016).

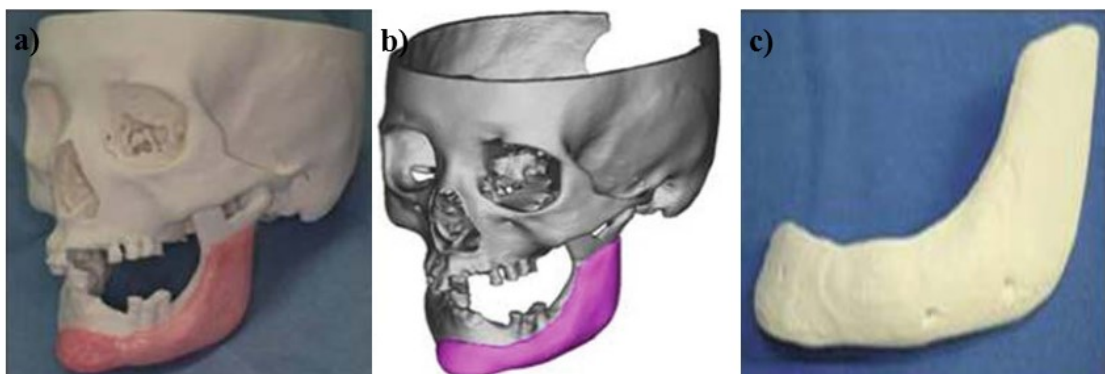


Figura 7 - Simulação através de um modelo tridimensional de um defeito ósseo na mandíbula, a) representação artificial em 3D do osso no modelo, b) simulação do osso artificial com base na TAC, c) imagem macroscópica do osso artificial impresso em 3D (Saijo *et al.*, 2009).

Este processo de impressão tem um especial interesse em comparação com os processos tradicionais de fabricação, pois permite originar diversas e complexas estruturas através do *design* assistido pelo computador e da construção espacial do material, camada a camada, com um controlo preciso sobre a composição espacial e a distribuição da microestrutura (Anssari Moin *et al.*, 2016; Jakus, Rutz, & Shah, 2016).

Presentemente, muitos materiais cerâmicos, polímeros, compósitos e metálicos podem ser utilizados na impressão em 3D. Prevê-se que, futuramente, a engenharia biomimética terá grande influência na regeneração de estruturas dentárias, exigindo materiais 3D porosos (Bose, Vahabzadeh, & Bandyopadhyay, 2013; Montazerian & Zanotto, 2016).

Prevê-se que até 2020, o recurso a amálgama e restaurações à base de resina irão sofrer um decréscimo, sendo substituídas por materiais criados por CAD/CAM, impressão em 3D e engenharia de tecidos. Os materiais que se afiguram a apresentar um “futuro promissor” neste sentido são a zircónia (ZrO_2), as vitrocerâmicas e as cerâmicas infiltradas com vidro (Montazerian & Zanotto, 2016).

O possível sucesso futuro da impressão a 3D de biomateriais deverá passar pela capacidade de controlo: do desgaste do material, das propriedades mecânicas, físicas, bioquímicas, e propriedades elétricas com vista a se lograr um maior controlo e otimização da interação celular e com o meio circundante do biomaterial, de modo a proporcionar a regeneração e função dos tecidos (Jakus *et al.*, 2016). A possível modificação da microestrutura e porosidade ainda carece de uma investigação mais aprofundada, por forma a conseguir controlar, por completo, os processos de osteointegração e a biologia peri-implante (Anssari Moin *et al.*, 2016).

1.4.1 Produção de implantes em 3D – testes *in vitro*

Em 2014, Chen *et al.* desenvolveram um implante em 3D personalizado e testaram o desempenho mecânico e biomecânico em estudos experimentais e simulações *in vitro*. Os mesmos concluíram que a impressão pela técnica seletiva de fusão a laser provou ser um meio eficiente de impressão de implantes dentários personalizados, totalmente densos, com alta resistência e com precisão dimensional, exibindo uma melhor distribuição de *stress* e estabilidade primária do que um implante com características *standard* (Chen *et al.*, 2014).

Lee & Jiang, fabricaram e testaram implantes de zircónia através de um sistema de impressão em pasta tridimensional. A partir dos resultados obtidos, foram conclusivos

quanto à qualidade dos implantes, provando que este tipo de impressão possui boa capacidade para fabricar implantes de zircónia em 3D (S.-Y. Lee & Jiang, 2015).

Osman *et al.* em 2017, investigaram a topografia da superfície e a precisão dimensional de um implante de zircónia impresso em 3D, com medidas personalizadas e as propriedades mecânicas de discos de zircónia impressos através da técnica de processamento de luz digital (DLP) (Figura 8). A DLP demonstrou ser eficiente para a impressão de implantes dentários personalizados de zircónia revelando precisão dimensional suficiente (Osman *et al.*, 2017).

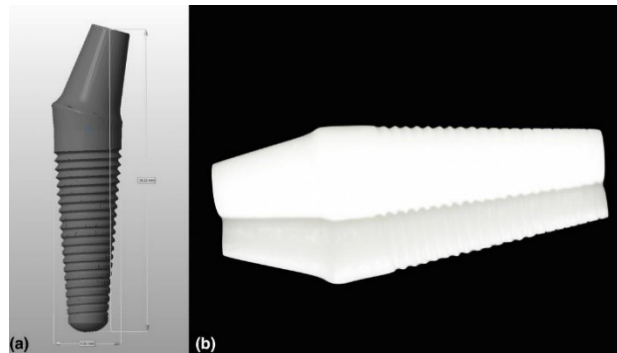


Figura 8 - *Designs* de a) implante 3D-CAD e b) implante impresso em 3D (Osman et al., 2017).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo o estudo *in vitro* da zircónia estabilizada com ítria, impressa em 3D (3YSZ), de forma a investigar adesão, viabilidade, proliferação e resposta osteogénica dos osteoblastos MG-63, quando comparada com o titânio tipo V.

O apuramento sobre a viabilidade do uso do mencionado material de reabilitação afigura-se de manifesta atualidade no âmbito da reabilitação com implantes dentários. A atualidade e acuidade do tema é evidenciada pelo facto de a zircónia estabilizada com ítria impressa em 3D poder ser utilizada em situações clínicas que podem desaconselhar outro tipo de intervenção, tendo igualmente vantagens ao nível estético, além de que, no limite, prevemos uma redução do custo de produção.

Nestes termos, assumimos a pretensão de que a presente investigação possa ter o nosso contributo científico na discussão do tema, tendo a firme determinação de que este trabalho possa vir a colaborar para a implementação da prática futura de novas técnicas no âmbito da reabilitação com implantes dentários, com recurso à nova geração de dispositivos médicos/biomateriais osteo-implantáveis.

Exposto o objetivo do presente projeto, e tendo sido evidenciada a atualidade e relevância do mesmo, caberá passar ao enquadramento comparativo dos materiais, técnicas e suas respostas biológicas, procurando sempre evidenciar a análise dos resultados obtidos na investigação levada a cabo, para, por fim, apresentar aquelas que são as nossas conclusões científicas da mesma.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

O projeto trata-se de um estudo de fase um, para testar a capacidade de osteointegração do material zircónia estabilizada com ítria, impresso em 3D, para uma posterior aplicação no âmbito da implantologia.

3.2 Local de realização do estudo

Esta investigação foi realizada no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, no departamento Centro de investigação interdisciplinar Egas Moniz (CiiEM), durante sete meses. O material estudado foi produzido e impresso em 3D, como demonstrado na Figura 9 (material fornecido pela empresa Innovnano), pelo departamento de Ciências dos Materiais da Faculdade de Ciências e Tecnologia (FCT).

3.3 Amostra estudada

Foram produzidas 21 placas em forma de paralelepípedo de 18 mm de lado e 2 mm de altura e 15 cilindros com 9 mm de diâmetro e 2 mm de altura de zircónia estabilizada com ítria impressa em 3D (3YSZ). Esta técnica consiste na impressão de uma pasta que é impressa a partir da fusão de um filamento polimérico através de uma impressora 3D (Figura 10 e Figura 11). O titânio de grau V (6AL-4V ELI) comercializado pela empresa SignoVinces foi utilizado neste trabalho como material de controlo. Desta forma, foram fabricadas 21 placas em forma de paralelepípedo de 23 mm de comprimento, 18 mm de largura e 2 mm de altura (Figura 10).

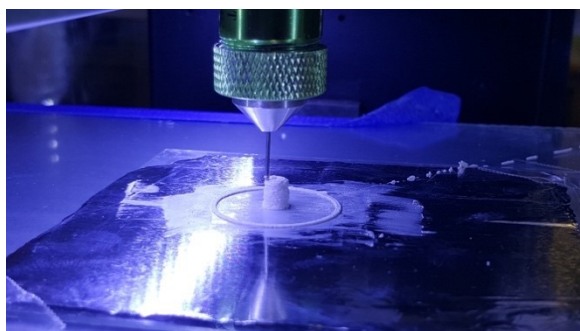


Figura 9 - Impressão em 3D de um cilindro do material 3YSZ, produzido pelo o departamento de Ciências dos Materiais da FCT.



Figura 10 - Amostras de titânio (esquerda) e 3YSZ (centro e direita).

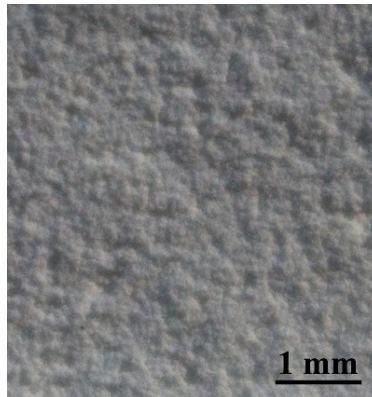


Figura 11 - Imagem macroscópica da superfície da amostra de 3YSZ.

3.4 Preparação das amostras

A esterilização dos materiais foi iniciada em isopropanol a 70% (Gibco) durante 15 minutos e de seguida ficaram submersas durante a noite em PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato, Gibco). Por fim, as amostras foram colocadas na autoclave para garantir a completa esterilização.

3.5 Análise por microscopia eletrónica de varrimento

A morfologia da superfície das amostras foi avaliada a partir de imagens obtidas através do microscópio eletrónico de varrimento (JSM-5400). Para isso, utilizou-se uma amostra de 3YSZ e uma amostra de titânio, ambas com a mesma forma de paralelepípedo. Iniciou-se a fixação com a submersão das amostras em glutaraldeído 2,3% em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,3 (Panreac Applichem), permanecendo nesta solução durante a noite. No dia seguinte removeu-se esta solução tampão e adicionou-se 2,5 mL de tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,3 (Panreac Applichem). As amostras ficaram nesta solução a uma temperatura de 4°C até se proceder à desidratação. Os materiais foram desidratados em etanol, em concentrações ascendentes (70%, 95% e 100%). De

seguida, embebeu-se por duas vezes as amostras em Treptanol líquido (Merck KGaA), colocando-se a 4°C e aguardando até à sua solidificação. Posteriormente colocaram-se as amostras no vácuo. Finalmente, após o revestimento por pulverização com paládio, os materiais foram examinados com um microscópio eletrónico de varrimento acoplado com uma câmara fotográfica.

3.6 Preparação da cultura celular

Na investigação, as células ósseas testadas foram MG-63 (ATCC® CRL1427TM), adquiridas na ATCC (Manassas, VA, USA). Esta linha provém de um osteossarcoma de um ser humano, com 14 anos e género masculino. O meio de crescimento utilizado para esta linha celular foi o *Eagle's Minimum Essential Medium* (ATCC). Optou-se por esta linha celular de osteoblastos MG-63, uma vez que as células do osteossarcoma são derivadas de tumores malignos compartilhando algumas características osteoblásticas (Pautke *et al.*, 2004).

As células foram mantidas congeladas em azoto líquido e para iniciar a cultura, estas foram descongeladas em banho maria a 37°C (durante 1-2m), e de seguida adicionadas a 9 mL de meio completo de DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium* (Gibco), constituído por 88% DMEM; 1% *Penicillin-Streptomycin* (Gibco); 1% *Fungizone* (ATCC) e 10% *Fetal Bovine Serum* (ATCC) num frasco de cultura (25 cm² de área) e incubadas a 37°C com 100% de humidade atmosfera e 5% de CO₂. As células aderentes foram mantidas até que atingissem a confluência de 80%, sendo nessa altura realizadas subculturas.

Para controlo a cultura celular foi observada ao microscópio ótico invertido, Figura 12. Para subcultivar as células, o meio foi removido e as células foram lavadas com três vezes o volume de PBS. Para libertar as células da parede do frasco usou-se tripsina-EDTA (Gibco) durante 5 minutos, a 37°C e 5% de CO₂. Para interromper a atividade enzimática da tripsina foi adicionado três vezes o volume de meio completo. Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação (125 rpm, durante 7m30s a 25°C), ressuspendeu-se cuidadosamente em meio completo pré-aquecido, depois foram colocadas em novos frascos para posterior cultura, ou usadas nas respetivas experiências. Para manter a viabilidade, seja durante as experiências seja entre subculturas, o meio foi mudado duas vezes por semana.

Por fim, procedeu-se à quantificação das células existentes na suspensão. Para essa contagem das células retirou-se 20 µl da suspensão e adicionou-se 20 µl de azul de tripano (Sigma-Aldrich) à suspensão anterior para se poder distinguir, as células viáveis das não viáveis. Adicionou-se uma amostra de suspensão num hemacitômetro para a estimativa da densidade celular. Após a contagem do número total de células, estas foram utilizadas para as experiências.

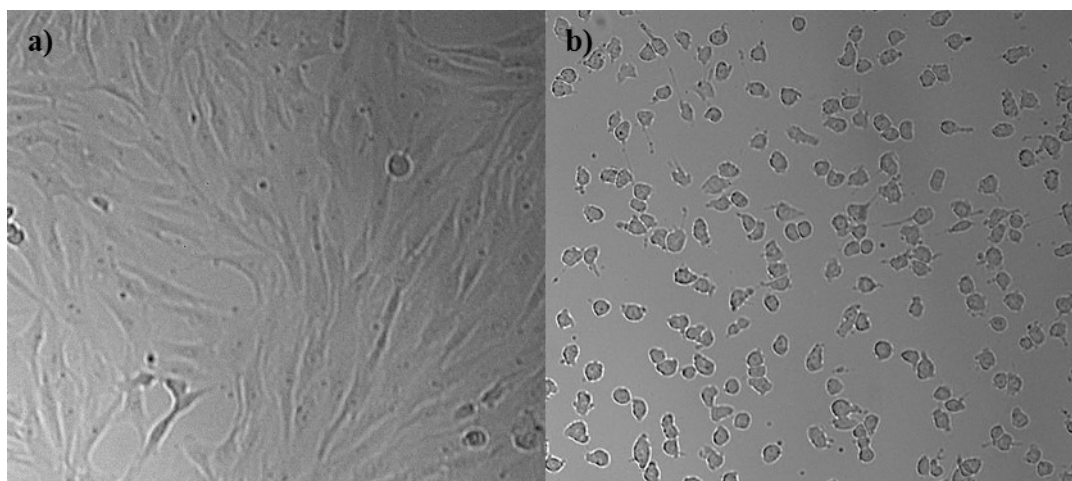


Figura 12 - a) Morfologia das células osteoblásticas em meio completo de DMEM, aderidas ao poliestireno do frasco de cultura; b) Morfologia das células osteoblásticas, quando estão submersas em tripsina. Observação a fresco em microscópio invertido x10.

3.7 Adesão celular

Na primeira avaliação da adesão celular foram utilizadas uma amostra de 3YSZ e uma de titânio em forma de paralelepípedo. Estas foram colocadas em placas de seis poços e foram semeadas com $2,6 \times 10^5$ células em cada poço.

A quantificação da adesão foi realizada aos 30 minutos, 2 e 4 horas (Felgueiras, 2011). Após cada período pretendido, o meio foi recolhido em tubos de ensaio para posterior contabilização. De seguida, as células foram lavadas com três vezes o volume de PBS. As amostras de 3YSZ e titânio foram colocadas em novos poços e adicionou-se 2 mL de tripsina-EDTA em cada poço (de forma a cobrir completamente a amostra). As placas foram colocadas na estufa durante 20 minutos, a 37°C e 5% de CO₂. Depois adicionou-se 2 mL de meio completo para inativar a tripsina e removeu-se a suspensão para os respetivos tubos (amostra e poço), para a quantificação das células (Figura 13).

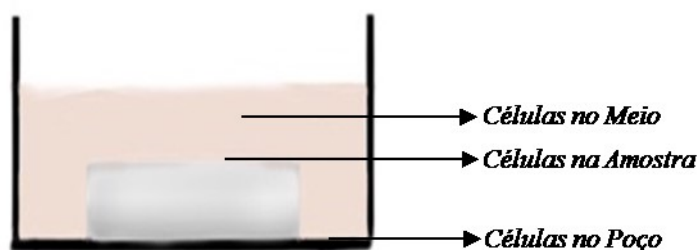


Figura 13 - Representação esquemática, numa visualização lateral da placa de um poço com uma amostra e meio de cultura. Demonstra os locais principais de onde as células são removidas e depois quantificadas.

Na quantificação das células aderidas aos 30 minutos, 2 e 4 horas, utilizou-se a técnica de contagem através do microscópio invertido a partir do hematocítmetro. Durante a quantificação também se procedeu à investigação da viabilidade celular, contabilizando as células viáveis e a células mortas (núcleo colorido).

Realizou-se uma segunda avaliação de adesão celular, com uma nova passagem de células independente, onde a adesão foi quantificada às 24 horas, em cinco amostras de 3YSZ e cinco amostras de titânio, em forma de paralelepípedo. Foram semeadas $1,6 \times 10^5$ células em cada poço com a respetiva amostra (Figura 14).

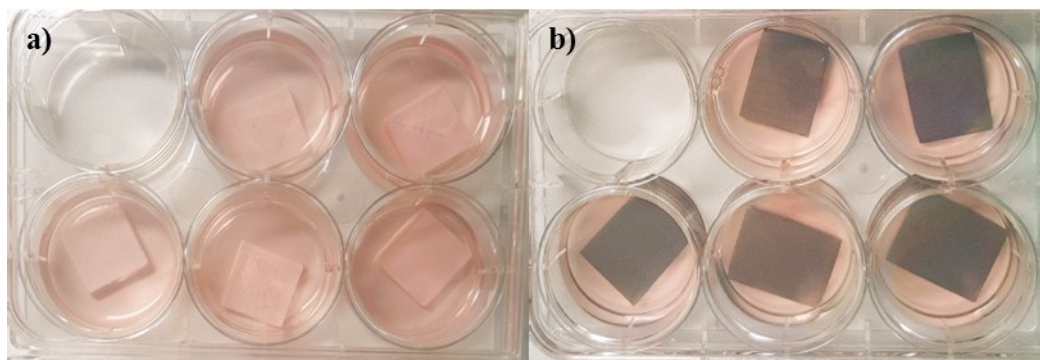


Figura 14 - Placas de 6 poços com as amostras a) 3YSZ e b) titânio imersas na suspensão contendo os osteoblastos células MG-63.

As células, após as 24 horas, foram quantificadas através da utilização do sal amarelo tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich) que, na presença de células viáveis, é reduzido por uma desidrogenase mitocondrial formando cristais de *formazan*, de cor roxa, insolúveis em água (Mosmann, 1983). A quantidade de absorvância do *formazan* reflete o nível de metabolismo celular, o que permite aferir sobre o número de células viáveis. Este teste foi feito para cada amostra independente em

triplicado. A 130 µl num *ependorf* adicionou-se 1/10 de volume de solução *stock* de MTT (5 mg/mL) e foram incubados na estufa durante 2 horas e 30 minutos, a 37°C e 5% de CO₂. Após esse tempo, centrifugou-se a 8000 rpm durante 7m30s. Eliminou-se o sobrenadante e de seguida adicionou-se igual volume de dimetilsulfóxido que dissolve os cristais de *formazan* (DMSO, Sigma-Aldrich). Seguidamente ficaram em repouso, sem luz, durante 30 minutos. O meio de cultura foi analisado simultaneamente para ser usado como brancos. Por fim, leu-se a absorvância a 492 nm com um leitor de microplacas (Platos R 496).

As amostras de 3YSZ e titânio, como se pode ver na Figura 10, não têm precisamente a mesma área. De forma a conseguir comparar os materiais, procedeu-se à normalização dos resultados obtidos das absorvâncias em relação à área de contacto. Para isso utilizou-se o valor 2,89 cm² para a amostra de 3YSZ e o valor 4,14 cm² para a amostra de titânio.

3.8 Proliferação celular

A avaliação da proliferação celular foi efetuada ao longo de sete dias. Utilizaram-se cinco amostras cilíndricas de 3YSZ, em cada um dos dias de avaliação, no 1º, 3º e 7º dia. Estas foram colocadas em placas de 24 poços e foram semeadas com $6,0 \times 10^4$ células em cada poço com a respetiva amostra. A proliferação foi avaliada na superfície da amostra de 3YSZ e na superfície controlo (poliestireno do frasco de cultura), sítio onde foram cultivadas células sem qualquer amostra. Depois do período pretendido removeu-se o meio de cada poço, lavou-se com PBS, e de seguida pela ação da tripsina as células foram desagarradas e quantificadas (procedimento realizado de modo semelhante descrito em 3.7 Adesão celular). Para a quantificação das células, utilizou-se o teste de MTT (procedimento mencionado anteriormente, em 3.7. Adesão celular). Este teste foi feito para cada amostra em triplicado.

3.9 Biomineralização

Para investigar a capacidade que os osteoblastos MG-63 tem para formar osso em contacto com 3YSZ e o titânio, procedeu-se a uma medida indireta por quantificação do mineral de fosfato de cálcio depositado. Para este teste utilizaram-se cinco amostras de 3YSZ e cinco de titânio, ambas em forma de paralelepípedo, em cada um dos dias de avaliação, 7º e 14º dia de mineralização. Para estas experiências os osteoblastos foram

cultivados em meio completo suplementado com 50 mM ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e 10 mM β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich) (Felgueiras, 2011). O procedimento para a quantificação do cálcio foi seguido de acordo com o método de Felgueiras (2011), com algumas alterações. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água Milli-Q. Após os tempos pretendidos, o meio foi removido, e lavou-se com três vezes o volume de TBS (Solução salina tamponada com Tris, Sigma-Aldrich). De seguida, colocaram-se as amostras em novas placas de seis poços e adicionou-se 2 mL de ácido tricloroacético 15% (TCA, Sigma-Aldrich) e incubou-se durante uma hora. Para a detecção de cálcio, retirou-se 200 μ L e destes foram analisados 10 μ L em triplicado. Em cada triplicado foi adicionado 1 mL de *Arsenazo* III (Sigma-Aldrich) preparado em 0,2 mM de PBS e incubou-se durante 15 minutos. Os níveis de cálcio (Ca^{2+}) foram quantificados por absorvância, usando um espectrofotómetro (Helios Epsilon) a 650 nm de absorvância. Foi realizada para cada análise uma curva de calibração a partir de uma série de soluções com cloreto de cálcio (CaCl_2) em TCA 15%, com as concentrações de cálcio: 0, 50, 100, 200, 500, 600, 800 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Felgueiras, 2011).

Para a detecção de fosfato, as amostras foram analisadas após 48 horas de incubação em TCA. Retirou-se 100 μ L de cada suspensão das amostras de titânio e 50 μ L de cada suspensão das amostras de 3YSZ sendo estas últimas diluídas com 50 μ L de TCA 15%. A cada amostra, adicionou-se, 800 μ L de solução AAM (esta solução continha: dois volumes de acetona (Carlo-Erbra), um volume de ácido sulfúrico (Acros) 2,5 mol/L e um volume de 10 mM de molibdato de amónio) e agitou-se vigorosamente. De seguida adicionou-se 80 μ L de ácido cítrico (Sigma-Aldrich) a 1 mol/L e agitou-se de novo fortemente. Esperou-se durante 30 minutos em repouso. Os níveis de fosfato produzido foram quantificados por absorvância, usando um espectrofotómetro (Helios Epsilon) a 355 nm. Foi realizada para cada análise uma curva de calibração com uma série de soluções de (di)hidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) em TCA 15%, com as concentrações de fosfato: 0, 10, 20, 40, 100, 120, 160 e 200 $\mu\text{g/mL}$ (Felgueiras, 2011).

3.10 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *software* IBM SPSSTM (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 24 para Windows® e Microsoft Excel® versão 2016.

Para o teste de adesão foi aplicado o teste de Mann-Whitney uma vez que não havia distribuição normal nas amostras de titânio. Nas restantes investigações aplicaram-se os testes de normalidade e *t-Student* para amostras independentes. Os resultados foram expressos em médias e desvio padrão. Os testes foram aplicados com nível de confiança de 95% e um nível de significância de 5% (0,05).

4 RESULTADOS

De acordo com o que já foi mencionado, o principal objetivo desta investigação consiste na avaliação da resposta dos osteoblastos MG-63 em contacto com um novo material de implantologia, a zircónia estabilizada com ítria impressa em 3D (3YSZ).

Numa primeira abordagem, analisou-se a superfície de cada material, posteriormente foram descritos os resultados do momento em que os osteoblastos entram em contacto com o material e a sua viabilidade, de seguida analisou-se se o material em questão tinha capacidade para que as células proliferassem. Por fim, de modo a testar a capacidade de mineralização, procedeu-se à quantificação de fosfato de cálcio produzido pela linha de osteoblastos MG-63.

4.1 Análise por microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento revelou diferenças entre as superfícies de 3YSZ e titânio, Figura 15. A superfície do material 3YSZ exibiu uma superfície rugosa e porosa, contendo poros de tamanho diferentes. Em contraste na amostra de titânio, observou-se uma superfície mais suave, com alguns sulcos e depressões. Constatou-se também uma diferença evidente na área disponível que o material 3YSZ apresentava, observou-se um aumento de área superficial em relação à superfície do titânio.

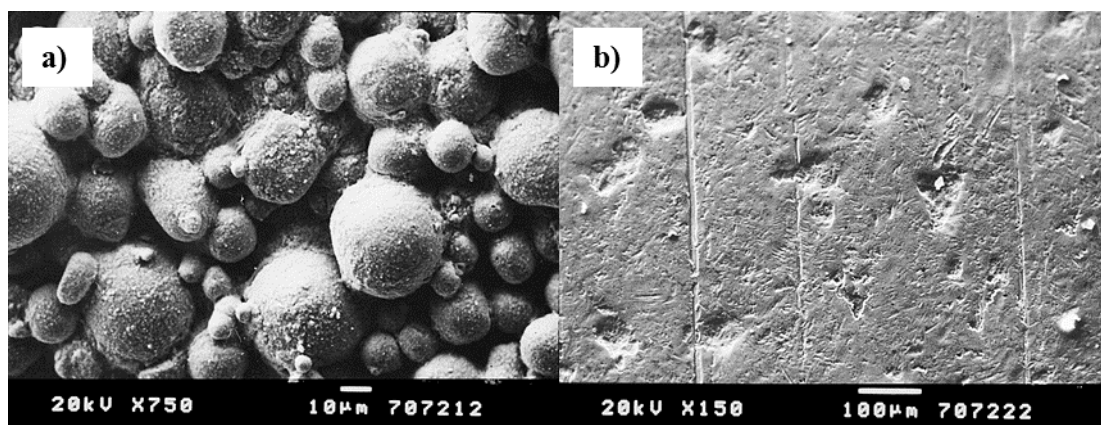


Figura 15 - Microestrutura da amostra a) 3YSZ e b) titânio, determinada por microscopia eletrónica de varrimento.

4.2 Adesão celular

A adesão celular dos osteoblastos MG-63 aos materiais 3YSZ e titânio foi analisada aos 30 minutos, 2 e 4 horas após contacto com 3YSZ e titânio. A sua quantificação foi efetuada a partir da contagem do número de células ao microscópio invertido, conforme demonstrado na Figura 16.

Na Figura 16 a) está representado o processo de adesão ao longo do tempo para o caso controlo. Neste ensaio foram quantificadas as células em suspensão e as aderidas ao material de poliestireno do poço, representando o comportamento esperado. Aos 30 minutos a maioria das células encontravam-se no meio em suspensão, com o avançar do tempo verificou-se que a quantidade de células em suspensão diminuiu acentuadamente e o número de células aderidas ao poço aumentou.

Em ambas as amostras, 3YSZ (Figura 16 b)) e titânio (Figura 16 c)), verificou-se um comportamento semelhante ao do controlo em que a maioria das células aos 30 minutos estavam em suspensão e com o passar das horas observou-se um declínio destas e um aumento no número de células que aderiam ao poço e às amostras. Em relação às amostras de 3YSZ e titânio, observou-se uma diferença no número absoluto de células. Na Figura 16 b) aos 30 minutos a amostra de 3YSZ apresentava $3,08 \times 10^3$ células aderidas e na Figura 16 c) a amostra de titânio apresentava $2,06 \times 10^3$ células aderidas.

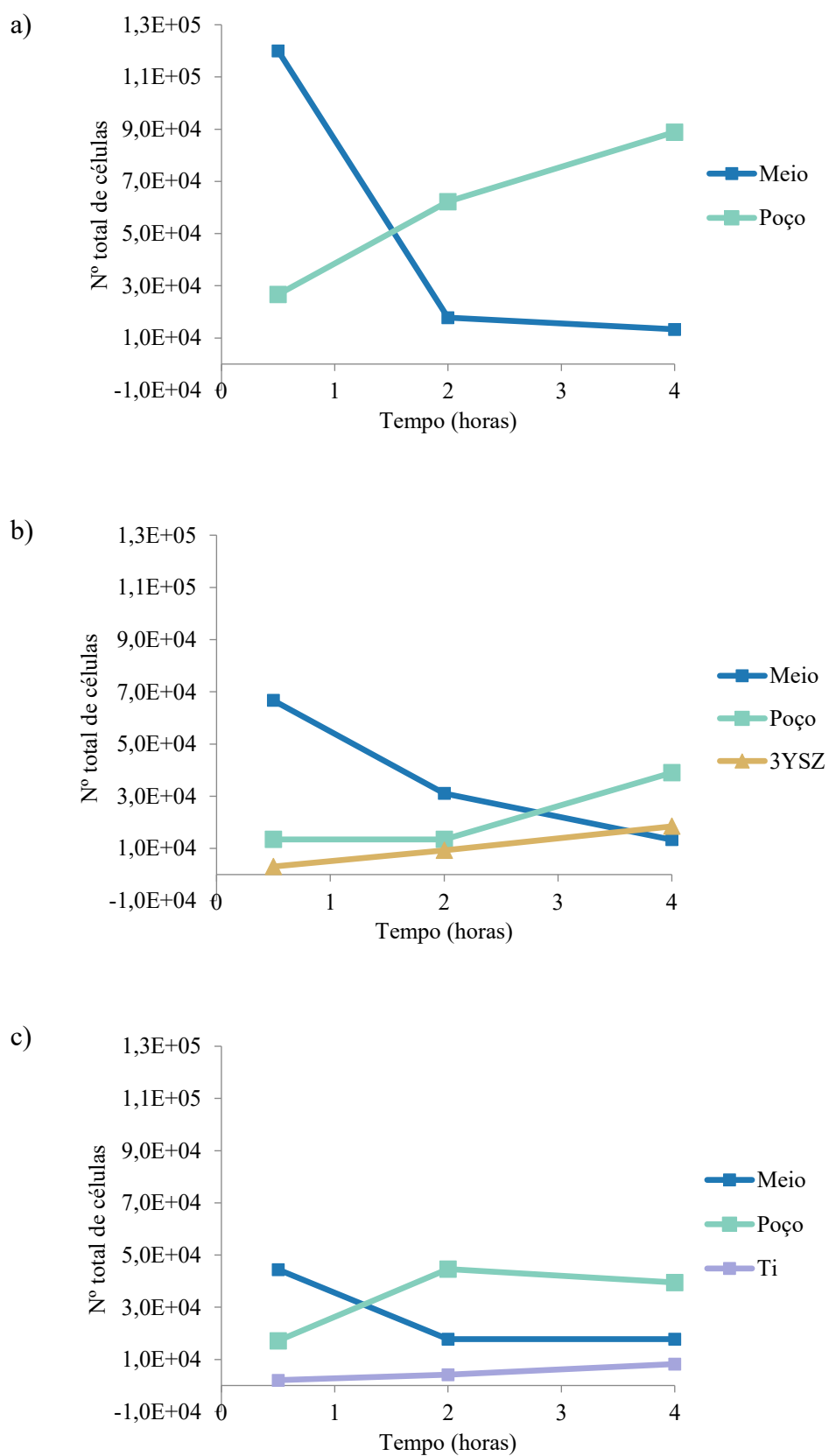


Figura 16 - Progresso da adesão celular na superfície a) controlo, b) 3YSZ e c) titânio aos 30m, 2h e 4h.

O material 3YSZ apresentava às 2 horas um número superior, $9,2 \times 10^3$ células aderidas à superfície, comparativamente ao titânio, $4,1 \times 10^3$ células. Às 4 horas verificou-se o mesmo, ou seja, um número maior de células aderidas ao material 3YSZ, $1,9 \times 10^4$ células, e menor para o titânio, $8,2 \times 10^3$ células. Em simultâneo, na mesma experiência, a viabilidade das células foi determinada com base na técnica do azul de tripano, tendo-se obtido para o material 3YSZ uma viabilidade entre os 75% e 100%, e para o titânio entre 66% e 100% (Tabela 6).

Tabela 6 - Viabilidade em percentagem das células MG-63 em contacto com o material 3YSZ e titânio, aos 30m, 2h e 4h.

	3YSZ	Titânio
30 Minutos	100%	100%
2 Horas	75%	66%
4 Horas	100%	100%

Dado o baixo número de células que foi possível contar para períodos tão curtos, este ensaio foi repetido com quantificação da adesão após 24 horas. Na investigação da adesão das células às 24 horas, utilizou-se o teste de MTT para quantificar o número de células aderidas. É comum utilizar-se o teste de MTT para quantificar o número de células numa razão diretamente proporcional à absorvância. De forma a confirmar esta correlação entre o valor de absorvância e o número de células existentes, esta foi testada nas condições do laboratório para esta linha celular (Figura 17). Neste gráfico observa-se que quanto maior o número de absorvância maior o número de células existentes.

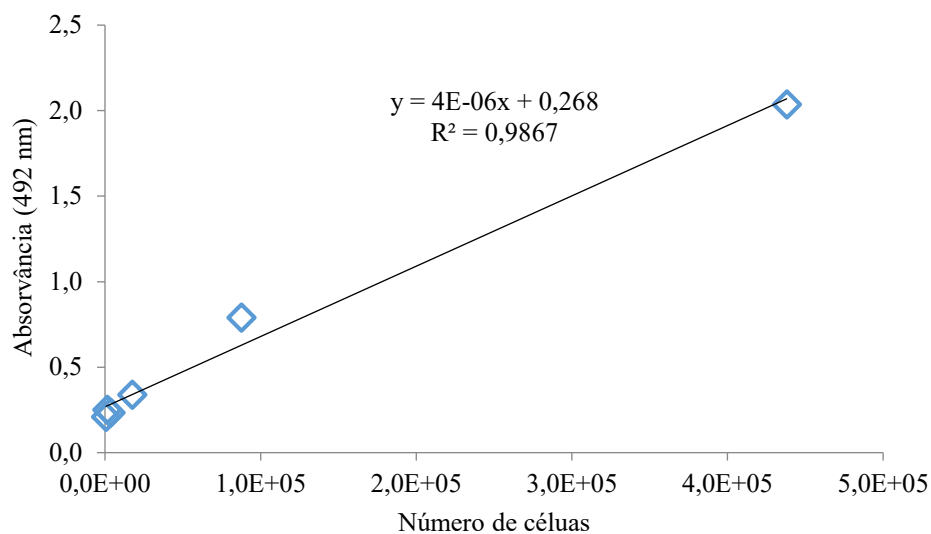


Figura 17 - Relação entre a absorvância e o número de células do Teste de MTT realizada com as células MG-63 osteoblastos.

Os resultados da adesão celular às 24 horas, estão representados na Figura 18 em forma de absorvância para cada amostra e controlo (poço sem amostras apenas com células). Os valores de absorvância foram normalizados pela área da superfície em cada caso para serem comparáveis. Em relação às amostras verificou-se uma diferença significativa ($p=0,032$) entre os materiais. O titânio apresentou um valor superior de 18% de células aderidas em relação ao material 3YSZ. O controlo apresentou uma maior taxa de células aderidas relativamente aos poços que continham as amostras, como previsto (Figura 18).

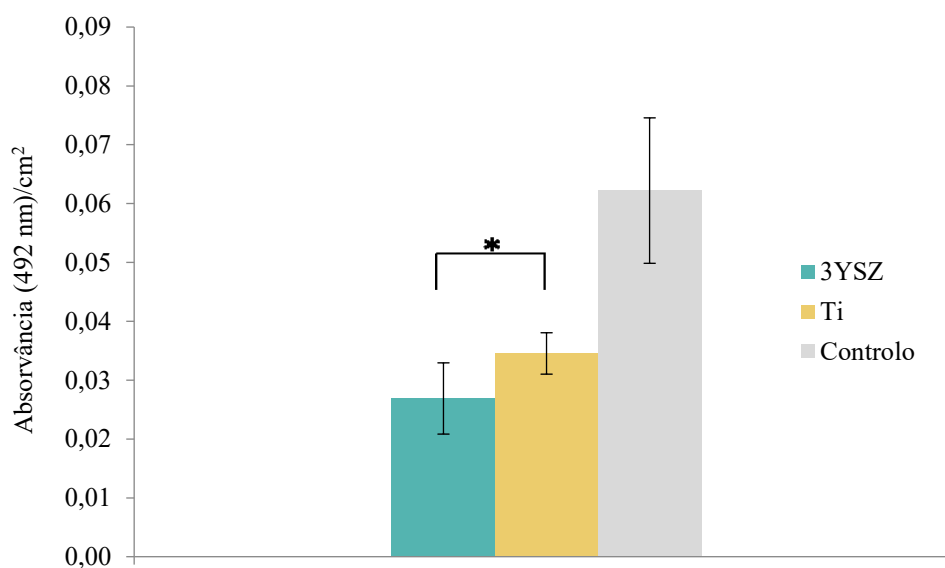


Figura 18 - Adesão dos osteoblastos MG-63 às 24h nas amostras de 3YSZ, de titânio (Ti) e no controlo. Os valores correspondem a médias \pm DP ($n=5$), $*p=0,032$.

4.3 Proliferação celular

Um material com boas características deve permitir a proliferação celular, desta forma a seguinte investigação debruçou-se sobre a proliferação dos osteoblastos MG-63 no material 3YSZ, tendo sido avaliada ao 1º, 3º e 7º dia. Esta quantificação foi feita a partir das células aderidas na amostra de 3YSZ e na superfície de controlo (material poliestireno). No 1º e 3º dia, a proliferação foi significativamente menor na superfície de 3YSZ ($p=0,001$) em relação à superfície de controlo (Figura 19). No intervalo de tempo do 1º para o 3º dia, houve um aumento de 5% da proliferação na superfície de 3YSZ. No entanto, do 3º para o 7º dia verificou-se um aumento de 637% da proliferação na amostra de 3YSZ.

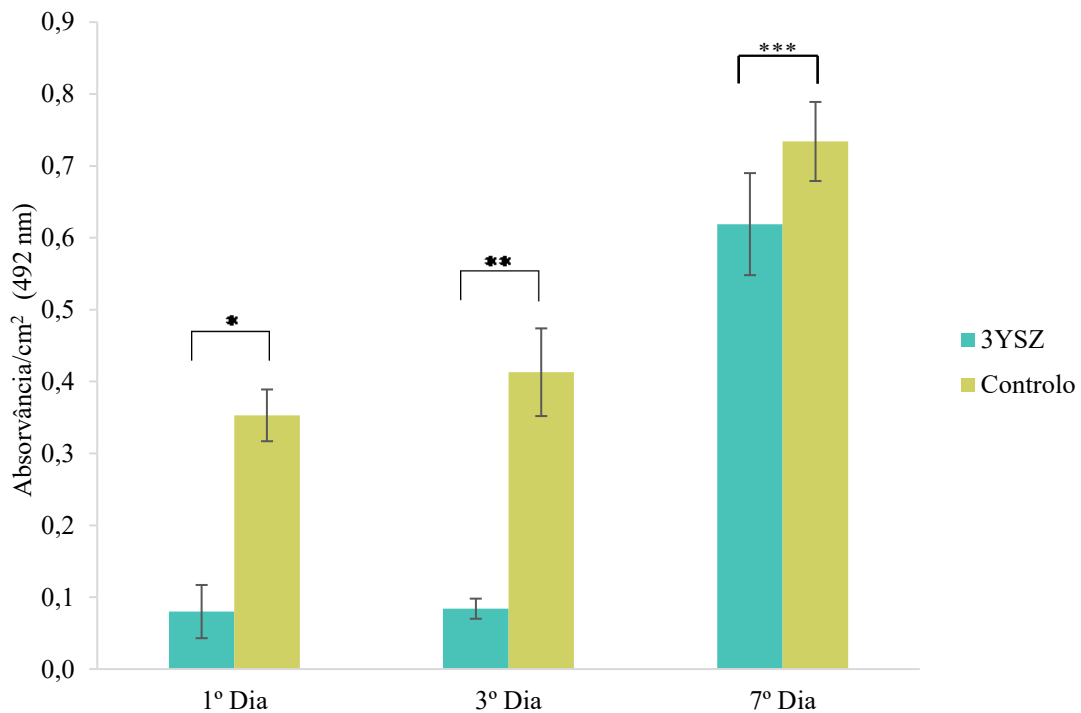


Figura 19 - Análise da proliferação celular (MG-63 osteoblastos) nas amostras de 3YSZ e no controlo ao 1º, 3º e 7º dia. Os valores correspondem a médias \pm DP ($n=5$), * $p=0,001$, ** $p=0,001$ e *** $p=0,022$.

4.4 Biomineralização

De forma a perceber a capacidade de mineralização de 3YSZ, quantificou-se o cálcio e fosfato produzido pelas células osteoblásticas MG-63 ao 7º e 14º dia de contacto com os materiais 3YSZ e titânio.

Na quantificação de cálcio (Figura 20), observou-se um aumento relevante ao longo do tempo, sendo que ao 7º dia, foi determinada uma quantidade de 62,1 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ para 3YSZ e de 6,96 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ para o titânio. No 14º dia foi observada uma quantidade de 130,7 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ na amostra de 3YSZ e 64,9 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ na amostra de titânio. Tanto no 7º como no 14º dia, foi notória a diferença significativa ($p < 0,001$) entre os materiais. Nos dias avaliados a amostra de 3YSZ apresentou um número significativamente maior na produção de cálcio em comparação com o titânio.

Na quantificação do fosfato no 7º dia, (Figura 21) amostra de 3YSZ apresentava uma quantidade de 81,2 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ e 4,9 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ na amostra de titânio. No 14º dia verificou-se 51,1 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ na amostra de 3YSZ e 4,1 $\mu\text{g}/(\text{mL.cm}^2)$ na amostra de titânio, de fosfato produzido. Neste dia existiu uma ligeira redução na produção de fosfato em ambas as amostras. Nos dias avaliados houve uma diferença significativa entre os materiais ($p < 0,001$). A quantidade de fosfato no titânio desde o 7º até ao 14º dia, foi muito constante e relativamente baixa, em contrapartida com 3YSZ que desde o 7º até ao 14º dia exibiu valores muito mais elevados na produção de fosfato.

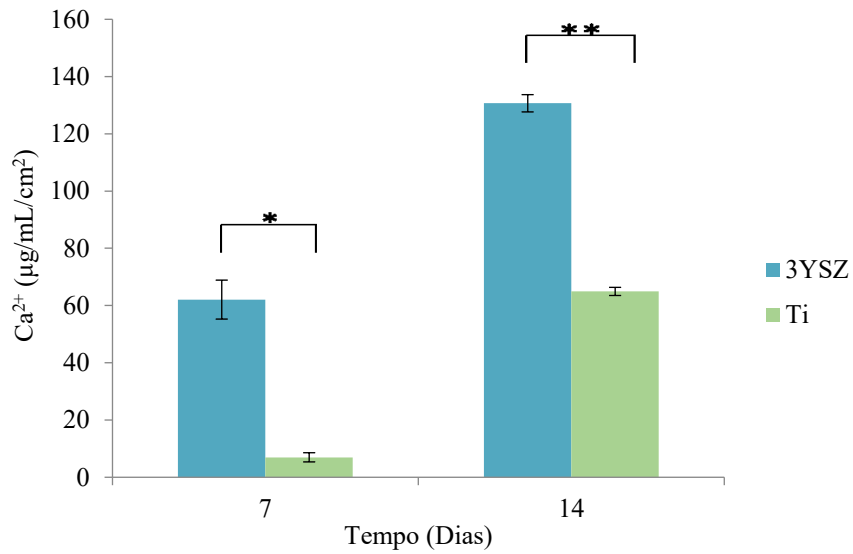


Figura 20 - Evolução da produção de Ca^{2+} pelas células MG-63 com o tempo nas amostras de 3YSZ e titânio (Ti). Os valores correspondem a médias \pm DP (n=5), *p<0,001 e **p<0,001.

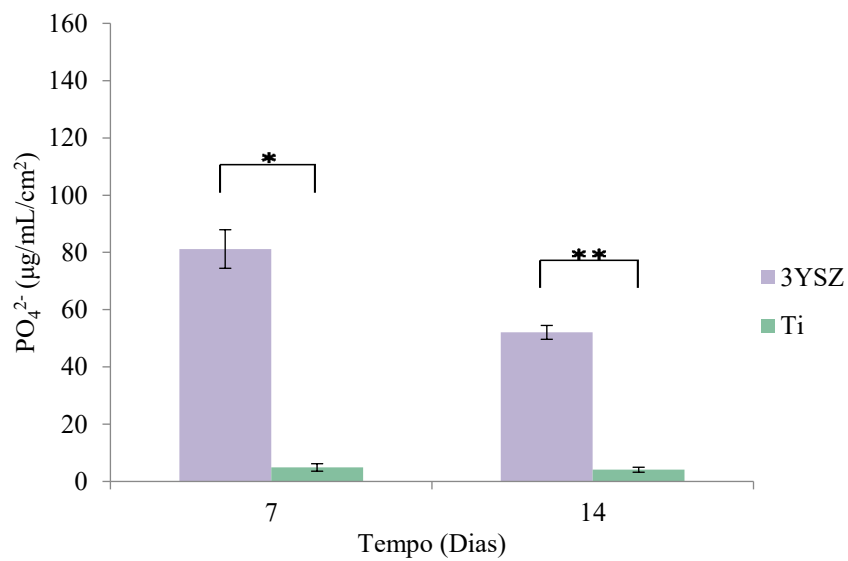


Figura 21 - Evolução da produção de PO_4^{2-} pelas células MG-63 com o tempo nas amostras de 3YSZ e titânio (Ti). Os valores correspondem a médias \pm DP (n=5), *p<0,001 e **p<0,001.

5 DISCUSSÃO

Os materiais aplicados em implantologia devem facilitar o processo da regeneração óssea, e consequentemente a proliferação celular, a diferenciação e a formação de matriz óssea.

A linha celular que se utilizou no nosso estudo, de osteoblastos MG-63 com características osteoblásticas (Pautke *et al.*, 2004), apresentou maior afinidade para adesão ao material 3YSZ, nos diferentes tempos estudados 30 minutos, 2 e 4 horas, quando comparada com o titânio. Este resultado foi semelhante ao obtido por Yamashita *et al.* (2009) que avaliaram a diferença na taxa de adesão celular à 1h, 3h e 6h, no 3Y-TZP (uma zircónia estabilizada com 3% mol de ítria) e no titânio puro, e verificaram que esta era superior para a 3Y-TZP (Yamashita *et al.*, 2009).

No decorrer dos nossos estudos, foi evidente o grande número de células MG-63 aderidas ao poço das placas, quando comparado ao número de células aderidas às amostras. Esta observação pode ser explicada pelo facto do poliestireno, material de que são feitas as placas de cultura, possuir carga negativa, o que vai propiciar a adesão celular (Curtis, Forrester, McInnes, & Lawrie, 1983; Teixeira, Anjos, Soares, Jr., & Conz, 2009).

Na avaliação da viabilidade das células em contacto com 3YSZ, pela técnica do azul de tripano, realizada em simultâneo com a contagem ao microscópio da adesão aos 30 minutos, 2 e 4 horas, a amostra de 3YSZ revelou valores de viabilidade entre os 75% e 100%, e o titânio entre 66% e 100%. Esta primeira análise permite aferir que 3YSZ exhibe um intervalo de viabilidade comparável ou superior ao titânio. Estes resultados são coincidentes com estudos que confirmam a viabilidade celular em contacto com pós de zircónia testados com diferentes linhas celulares através de vários métodos (viabilidade de células e testes de MTT) (Dion *et al.*, 1994; Gautam *et al.*, 2016; Li, Liu, Hermansson, & Söremark, 1993). Strickstock *et al.* (2017) também avaliaram a viabilidade dos osteoblastos em contacto com diferentes graus de rugosidade de zircónia policristalina tetragonal estabilizada com ítria (Y-TZP), e chegaram à conclusão que as células exibiam viabilidade superior a 95% sem efeitos citotóxicos (Strickstock *et al.*, 2017). Ainda assim, é necessário um número maior de amostras (n=1) para aferir sobre a viabilidade do material 3YSZ.

Por ser um método mais rigoroso de contagem celular qualitativa optou-se pelo teste de MTT na avaliação da adesão celular às 24 horas. Mosmann, em 1983, refere que o teste de MTT possui várias vantagens, tais como: a capacidade que tem para clivar todas

as células vivas, a velocidade a que as amostras podem ser processadas resultando na possibilidade de gerir grandes quantidades de dados e uma quantificação precisa (Mosmann, 1983).

Na avaliação de adesão celular às 24 horas, o controlo apresentou um número maior de células do que as amostras de 3YSZ e de titânio devido à maior afinidade para o material dos frascos de cultura. Em relação à quantidade de células que se encontravam aderidas às amostras verificou-se um ligeiro aumento (18%) no número de células aderidas na amostra de titânio. Uma possível explicação para este facto, de acordo com a literatura, poderá ser devido às diferentes topografias que os materiais apresentam (3YSZ exhibe uma superfície mais irregular). De acordo com Harvey *et al.* (2013), as características topográficas tais como os sulcos ou elevações podem influenciar o comportamento da adsorção das proteínas. Adicionalmente, a curvatura da superfície pode, posteriormente, tornar os recetores para as células mais acessíveis ou menos acessíveis. Esses pontos de ancoragem permitem que as células se consigam mover e espalhar pela superfície (Harvey, Hill, & Bayat, 2013). Segundo Felgueiras (2011) e Guifang *et al.* (2016) no titânio e nas suas ligas, quando são expostos ao ar ou à água, forma-se espontaneamente uma camada de dióxido, ao qual se dá o nome de condição passiva de titânio. O surgimento desta camada de óxido superficial pode acentuar a biocompatibilidade e osteointegração do titânio (Felgueiras, 2011; G. Wang *et al.*, 2016). Surge desta forma outra explicação para a diferença referida entre o material 3YSZ e titânio. Já Depprich *et al.*, em 2008, obtiveram resultados em sentido contrário através da análise de discos de Y-TZP e titânio puro, ambos com tratamento ácido na superfície, às 24 horas. Nessa avaliação registaram um maior número de células aderidas ao Y-TZP do que ao titânio (Depprich *et al.*, 2008).

Os diferentes métodos de quantificação, o processo de recuperação das células aderidas às amostras e o facto do material 3YSZ ser um material mais poroso que o titânio poderá estar na origem das diferentes taxas de adesão de células entre os 30 minutos, 2, 4 e 24 horas.

Uma das limitações do nosso trabalho foi o reduzido número de amostras no teste de adesão aos 30 minutos, 2 e 4 horas e no teste de viabilidade, pelo que os testes deverão ser repetidos com o mesmo processo de quantificação celular (teste de MTT) utilizado no teste de adesão às 24 horas. Uma vez que 3YSZ é um material poroso seria também vantajoso a observação das amostras ao microscópio eletrónico de varrimento, de forma a perceber se as células encontram-se aderidas em profundidade (dentro dos poros) na

amostra. Se se repetir o teste de adesão aos 30 minutos, 2 e 4 horas e se verificar que 3YSZ continua com valores superiores ao titânio, mesmo apresentando às 24 horas 3YSZ valores inferiores ao titânio, uma possível explicação será pela porosidade que o material tem. Através da porosidade as células vão conseguir migrar mais em profundidade, tornando a sua recuperação através da técnica da tripsina, um processo mais difícil. Em contrapartida, se no teste de adesão aos 30 minutos, 2 e 4 horas se obtiver um número inferior de células aderidas a 3YSZ, continuando às 24 horas com valores inferiores ao titânio, surge como possível explicação a topografia do material 3YSZ, que possivelmente não será a mais vantajosa para a adesão celular.

Uma forma de perceber se o material permite uma osteointegração com sucesso, consiste na capacidade de as células proliferarem sobre o material. No nosso estudo, verificámos que a proliferação celular ao longo do tempo aumentou, o que seria de esperar que acontecesse num material com boas propriedades de osteointegração. Do primeiro para o terceiro dia, observou-se um aumento discreto de 5% de células em contacto com a amostra de 3YSZ, o que poderá estar relacionado com a fase *lag* do crescimento celular. A fase *lag* do padrão característico do crescimento celular corresponde ao período de adaptação, no qual não se observa variação no número de células (Freshney, 2010). Do terceiro para o sétimo dia houve um aumento exponencial do crescimento celular. Observou-se uma diferença significativa entre o 3YSZ e o controlo. Tal como para a adesão, o material de controlo apresentou em todos os dias de avaliação, um número superior de células. Este fenómeno pode ser justificado pelo material dos frascos de cultura e pelas suas características favoráveis às culturas celulares.

Os resultados do estudo de Depprich *et al.* (2008), com Y-TZP, estão em concordância com os que nós obtivemos, aumento evidente do terceiro para o sétimo dia. Idênticos resultados foram obtidos por Han *et al.* (2011) ao comparar Y-TZP com titânio, tendo verificado que a zircónia apresentava um número significativamente maior de células ao sétimo dia (S. Han *et al.*, 2011). Recentemente, o trabalho de Hadjicharalambous *et al.* (2015), também apresentou semelhanças com os resultados que obtivemos para a proliferação celular. Na avaliação da proliferação entre duas cerâmicas, uma estabilizada com ítria e outra com magnésio, YSZ e MgSZ, o número de células viáveis foi maior em YSZ durante todo o período de cultura (Hadjicharalambous, Mygdali, *et al.*, 2015).

Outro fator que nos parece importante salientar e que poderá influenciar a proliferação celular é a porosidade. Hadjicharalambous *et al.* (2015), testaram diferentes porosidades de zircónia estabilizada com ítria, e chegaram à conclusão que a proliferação ao oitavo

dia era superior nos materiais em que a porosidade aumentou de 23% para 49%. Uma vez que a porosidade é uma característica intrínseca no material 3YSZ, admitimos que proliferação ao 7º dia pode estar relacionada com o grau de porosidade que o material exhibe. Através do SEM, observou-se que 3YSZ é um material poroso e rugoso e o titânio exhibe uma superfície mais lisa. Hadjicharalambous *et al.* (2015) chegaram à conclusão que biomateriais porosos permitem boas respostas biológicas e possuem propriedades mecânicas semelhantes ao osso cortical, sugerindo o seu potencial para usar como matriz para a regeneração óssea. Hadjicharalambous *et al.* (2015), demonstraram que na zircónia estabilizada com ítria, mais porosa, havia uma maior interconexão entre os poros dentro da amostra, resultando numa melhor circulação de meio nutritivo para as células, tendo como consequência promover a migração e o desenvolvimento das células (Hadjicharalambous, Mygdali, *et al.*, 2015).

Assim, e pela semelhança dos nossos resultados com os de outros estudos, podemos inferir que o material 3YSZ permite uma boa proliferação das células osteoblásticas num curto espaço de tempo, podendo-se considerar que possui uma das características ideais para o desenvolvimento de uma osteointegração bem-sucedida.

Outra particularidade importante para a osteointegração de um material é o seu poder osteogénico, e no 3YSZ, existiu uma diferença significativa entre 3YSZ e titânio, relativamente às quantidades observadas de cálcio e fósforo, no sétimo e no décimo quarto dia. A quantidade de fósforo de cálcio produzida pelos osteoblastos no 3YSZ foi superior aos valores quantificados no titânio. Como na adesão celular às 24 horas se verificou um número de células aderidas ao titânio superior relativamente ao 3YSZ, seria de esperar que existisse maior quantidade de fósforo de cálcio no titânio. Mesmo apresentando menos osteoblastos aderidos, o 3YSZ apresentou maior quantidade de fósforo de cálcio.

De acordo com a literatura, existem diferentes marcadores para investigar a atividade osteoblástica, nomeadamente a produção de colagénio, a mineralização do cálcio e a atividade da fosfatase alcalina (pico de produção por volta do sétimo dia, em média). No início da mineralização da matriz também são expressos os genes que codificam a osteocalcina, a sialoproteína óssea e a osteopontina (Y. D. Cho *et al.*, 2014; Hadjicharalambous, Buyakov, Buyakova, Kulkov, & Chatzinikolaidou, 2015). Outro método aceite para avaliação da atividade osteogénica e por nós utilizado é a quantificação de fósforo de cálcio que para o 3YSZ demonstrou sempre ser superior relativamente ao titânio. Hadjicharalambous *et al.* (2015) verificaram uma maior atividade osteoblástica em cerâmicas YSZ, quando comparadas com MgSZ e observaram

maior quantidade de cálcio depositado (Hadjicharalambous, Mygdali, *et al.*, 2015). Assim, em relação à resposta osteogénica estes resultados são concordantes com os nossos. Recentemente, Hadjicharalambous *et al.* (2015) testaram diferentes materiais cerâmicos, nomeadamente a alumina, a zircónia estabilizada com ítria e o compósito zircónia–alumina com porosidades semelhantes, em contacto com pré-osteoblastos. Após catorze dias, a deposição de cálcio foi quase duas vezes maior dentro das superfícies porosas (Hadjicharalambous, Buyakov, *et al.*, 2015). Em 2017, Gapski e Martinez avaliaram a resposta osteogénica dos osteoblastos às 24, 48 e 96 horas, nas superfícies de zircónia e titânio. Os mesmos também verificaram que a zircónia, tal como os nossos resultados, apresentava níveis superiores em relação ao titânio (Gapski & Martinez, 2017). German *et. al* (2014), avaliaram qualitativa e quantitativamente a mineralização da matriz, e verificaram que no titânio só se observou a partir do décimo quarto dia (German, Osei-Bempong, Knuth, Deehan, & Oldershaw, 2014). Estes valores vão de encontro aos nossos resultados obtidos na quantificação de fosfato de cálcio pelo titânio. O 3YSZ impresso em 3D exibiu valores de cálcio e fosfato muito superiores ao titânio, demonstrando ainda uma reposta de mineralização promissora para a produção de material de implante.

6 CONCLUSÃO

Com base no nosso trabalho podemos inferir que:

- O material 3YSZ aparenta ser biologicamente, se não comparável, superior ao titânio;
- O material 3YSZ demonstrou uma adesão celular nos períodos iniciais (30 minutos, 2 e 4 horas), superior ao titânio. Às 24 horas, o titânio demonstrou um ligeiro aumento de 18% de células aderidas em relação a 3YSZ;
- Na avaliação da viabilidade, 3YSZ revelou intervalos de viabilidade superiores ou comparáveis ao titânio;
- O material 3YSZ demonstrou ser um material que permite a proliferação celular, verificando-se um evidente aumento de células proliferadas do terceiro dia para o sétimo dia;
- As imagens obtidas através do SEM mostraram que 3YSZ apresentava porosidade, rugosidade e exibia uma área superficial superior ao titânio;
- A aptidão de 3YSZ para originar biomineralização foi evidente, uma vez que mostrou grandes quantidades de fosfato de cálcio produzido pelas células osteoblásticas, apresentando diferenças significativas relativamente ao titânio.

O presente estudo mostrou que os osteoblastos MG-63 são capazes, *in vitro*, de se aderir, proliferar e mineralizar em superfícies de zircónia estabilizada com ítria impressa em 3D, sugerindo que o material cerâmico testado poderá apresentar boa biocompatibilidade e osteointegração. Os resultados obtidos são promissores para uma futura aplicação da zircónia estabilizada com ítria impressa em 3D, no âmbito da implantologia, em doentes.

Perspetivas futuras

Será necessário realizar testes *in vitro* com um número maior de amostras de zircónia estabilizada com ítria impressa em 3D. São necessários mais testes que permitam conhecer ao pormenor o comportamento deste material, uma vez que este se pode tornar num possível substituto do titânio em situações selecionadas.

Os testes *in vitro*, em geral, são estáticos, uma vez que não se consegue simular a dinâmica biológica, ou seja, as condições a que um material fica sujeito quando é inserido

num organismo vivo. É importante compreender o comportamento em condições biológicas de 3YSZ, nomeadamente o poder de osteointegração *in vivo*. A relevância clínica dos resultados obtidos deverá ser confirmada em estudos realizados em animais e posteriormente em aplicações clínicas a longo prazo.

De acordo com a literatura a zircónia apresenta um melhor comportamento do ponto de vista microbiológico em relação ao titânio. Se o material 3YSZ cumprir a função temporal, poderá ser um possível substituto do titânio em situações seleccionadas.

A introdução da personalização dos implantes através da impressão em 3D, terá num breve futuro um lugar muito promissor. Em relação ao custo da maquinação do material, este não será uma barreira intransponível, pois com o avançar da tecnologia, com uma maior preferência pela qualidade e com um aumento da produção, o preço tenderá a baixar. No entanto ainda são necessários mais estudos para recomendar o seu uso clínico. O presente estudo abre um caminho para futuras investigações do material zircónia estabilizada com ítria impressa em 3D.

7 BIBLIOGRAFIA

- 3YSZ - Powders / Applications | Innovnano Materials. (n.d.). Retrieved September 25, 2017, from <http://www.innovnano.pt/our-powders-applications-3ysz/>
- Ali, S., Karthigeyan, S., Deivanai, M., & Mani, R. (2014). Zirconia : Properties and application — a review. *Journal Pakistan Oral & Dental*, 34(1), 178–183.
- Altmann, B., Rabel, K., Kohal, R. J., Proksch, S., Tomakidi, P., Adolfsson, E., ... Steinberg, T. (2016). Cellular transcriptional response to zirconia-based implant materials. *Dental Materials*, 33(2), 241–255. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.12.005>
- Andreiotelli, M., & Kohal, R. J. (2009). Fracture strength of zirconia implants after artificial aging. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 11(2), 158–166. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2008.00105.x>
- Anssari Moin, D., Hassan, B., & Wismeijer, D. (2016). A novel approach for custom three-dimensional printing of a zirconia root analogue implant by digital light processing. *Clinical Oral Implants Research*, 1–3. <https://doi.org/10.1111/clr.12859>
- Assal, P. (2013). The Osseointegration of Zirconia Dental Implants. *Research and Science*, 123, 644–654.
- Baxter, L. C., Frauchiger, V., Textor, M., Gwynn, I. ap, & Richards, R. G. (2002). Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *European Cells and Materials*, 4, 1–17. <https://doi.org/10.22203/eCM.v004a01>
- Bergemann, C., Duske, K., Nebe, J. B., Schöne, A., Bulnheim, U., Seitz, H., & Fischer, J. (2015). Microstructured zirconia surfaces modulate osteogenic marker genes in human primary osteoblasts. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 26(1), 2–11. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5350-x>
- BioImplant Ceramic Root Analogue RAI Dental Implant Solutions immediate anatomic ceramic dental implant. (n.d.). Retrieved September 27, 2017, from <http://www.bioimplant.at/>

- Bollen, C. M. (2017). Zirconia: The Material of Choice in Implant Dentistry? An Update. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy*, 6(6), 1–4. <https://doi.org/10.15406/jdhodt.2017.06.00219>
- Bose, S., Vahabzadeh, S., & Bandyopadhyay, A. (2013). Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*, 16(12), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.11.017>
- Brydone, A. S., Meek, D., & MacLaine, S. (2010). Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Journal of Engineering in Medicine*, 224(12), 1329–1343. <https://doi.org/10.1243/09544119JEIM770>
- Buser, D., Sennerby, L., & Bruyn, H. De. (2017). Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontology 2000*, 73, 7–21. <https://doi.org/10.1111/prd.12185>
- Chappuis, V., Cavusoglu, Y., Gruber, R., Kuchler, U., Buser, D., & Bosshardt, D. D. (2015). Osseointegration of Zirconia in the Presence of Multinucleated Giant Cells. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 18(5), 686–698. <https://doi.org/10.1111/cid.12375>
- Chen, J., Zhang, Z., Chen, X., Zhang, C., Zhang, G., & Xu, Z. (2014). Design and manufacture of customized dental implants by using reverse engineering and selective laser melting technology. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 112(5), 1088–1095. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2014.04.026>
- Cho, Y. D., Shin, J. C., Kim, H. L., Gerelmaa, M., Yoon, H. I., Ryoo, H. M., ... Han, J. S. (2014). Comparison of the osteogenic potential of titanium and modified zirconia-based bioceramics. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4442–4452. <https://doi.org/10.3390/ijms15034442>
- Cho, Y., Hong, J., Ryoo, H., Kim, D., Park, J., & Han, J. (2015). Osteogenic Responses to Zirconia with Hydroxyapatite Coating by Aerosol Deposition. *Journal of Dental Research*, 94(3), 491–499. <https://doi.org/10.1177/0022034514566432>
- Curtis, A. S. G., Forrester, J. V., McInnes, C., & Lawrie, F. (1983). Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *Journal of Cell Biology*, 97(5 I), 1500–1506.

<https://doi.org/10.1083/jcb.97.5.1500>

Davies, J. E. (1996). In Vitro Modeling of the Bone Implant Interface. *The Anatomical Record*, 245, 426–445. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199606\)245](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245)

Depprich, R., Ommerborn, M., Zipprich, H., Naujoks, C., Handschel, J., Wiesmann, H.-P., ... Meyer, U. (2008). Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head & Face Medicine*, 4(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-4-29>

Dion, I., Bordenave, L., Lefebvre, F., Bareille, R., Baquey, C., Monties, J. R., & Havlik, P. (1994). Physico-chemistry and cytotoxicity of ceramics - Part II Cytotoxicity of ceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5(1), 18–24. <https://doi.org/10.1007/BF00121148>

Felgueiras, H. (2011). *MG63 osteoblast-like cells response to surface modified commercially pure titanium*. Universidade do Minho Escola de Engenharia.

Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells* (sixth).

Gapski, R., & Martinez, E. F. (2017). Behavior of MC3T3-E1 Osteoblastic Cells Cultured on Titanium and Zirconia Surfaces: An In Vitro Study. *Implant Dentistry*, 26(3), 1. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000543>

García, A. J., & Reyes, C. D. (2005). Bio-adhesive Surfaces to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Journal of Dental Research*, 84(5), 407–413. <https://doi.org/10.1177/154405910508400502>

Gautam, C., Joyner, J., Gautam, A., Rao, J., & Vajtai, R. (2016). Zirconia based dental ceramics: structure, mechanical properties, biocompatibility and applications. *Dalton Transactions*, 45(48). <https://doi.org/10.1039/C6DT03484E>

Gebran, M. P., & Wassal, T. (2007). Avaliação in vitro da adesão de osteoblastos sobre implantes osseointegráveis com superfície tratada (Titamax II ®). *ImplantNews*, 4, 79–84.

German, M. J., Osei-Bempong, C., Knuth, C. A., Deehan, D. J., & Oldershaw, R. A. (2014). Investigating the biological response of human mesenchymal stem cells to

- titanium surfaces. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13018-014-0135-y>
- Giancotti, F., & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science's Compass*, 285, 1028–1032. <https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1028>
- Gremillard, L., & Chevalier, J. (2008). Durability of Zirconia-based Ceramics and Composites for Total Hip Replacement. *Key Engineering Materials*, 363, 791–794. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.361-363.791>
- Gungor, M. B., Aydın, C., Yılmaz, H., & Gul, E. B. (2014). An Overview of Zirconia Dental Implants: Basic Properties and Clinical Application of Three Cases. *Journal of Oral Implantology*, 11(4), 485–494. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-12-00109>
- Hadjicharalambous, C., Buyakov, A., Buyakova, S., Kulkov, S., & Chatzinikolaidou, M. (2015). Porous alumina, zirconia and alumina/zirconia for bone repair: fabrication, mechanical and in vitro biological response. *Biomedical Materials*, 10(2). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/2/025012>
- Hadjicharalambous, C., Mygdali, E., Prymak, O., Buyakov, A., Kulkov, S., & Chatzinikolaidou, M. (2015). Proliferation and osteogenic response of MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells on porous zirconia ceramics stabilized with magnesia or yttria. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(11), 3612–3624. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35475>
- Hafezeqoran, A., & Koodaryan, R. (2017). Effect of Zirconia Dental Implant Surfaces on Bone Integration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/9246721>
- Haj, A. J. El, Wood, M. A., Thomas, P., & Yang, Y. (2005). Controlling cell biomechanics in orthopaedic tissue engineering and repair. *Pathologie Biologie*, 53, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.002>
- Han, J., Hong, G., Lin, H., Shimizu, Y., Wu, Y., Zheng, G., ... Sasaki, K. (2016). Biomechanical and histological evaluation of the osseointegration capacity of two types of zirconia implant. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 6507–6516.

- Han, S., Kim, K., Han, J., Koo, K., Kim, T., Seol, Y., ... Rhyu, I. (2011). Response of osteoblast-like cells cultured on zirconia to bone morphogenetic protein-2. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 227–233.
- Hannink, R. H. J., Kelly, P. M., & Muddle, B. C. (2000). Transformation Toughening in Zirconia-Containing Ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, 83(3), 461–487. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1987.tb04865.x>
- Harvey, A., Hill, E., & Bayat, A. (2013). Designing implant surface topography for improved biocompatibility. *Expert Review of Medical Devices*, 10(2), 257–67. <https://doi.org/10.1586/erd.12.82>
- Heuer, A. H. (1987). Transformation Toughening in ZrO₂-Containing Ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, 70(10), 689–698. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1987.tb04865.x>
- Heuer, A. H., Lange, F. F., Swain, M. V., & Evans, a G. (1986). Transformation Toughening: An Overview. *Journal of the American Ceramic Society*, 69(3), i–iv. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1986.tb07400.x>
- Hisbergues, M., Vendeville, S., & Vendeville, P. (2008). Review zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 519–529. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31147>
- Hochscheidt, C. J., Alves, E. D. M., Bernardes, L. A. B., & Hochscheidt, R. C. (2011). Implantes dentários em zircônia : uma alternativa para o presente ou para o futuro ? (Parte I). *Dental Press Implantology*, 5(4), 100–110.
- Hoffmann, O., Angelov, N., Gallez, F., Jung, R. E., & Weber, F. E. (2008). The zirconia implant-bone interface: a preliminary histologic evaluation in rabbits. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 23(4), 691–695.
- Hosseini, S. H., Kazemian, M., & Ghorbanzadeh, S. (2015). A brief overview of cellular and molecular mechanisms of osseointegration. *International Journal of Contemporary Dental and Medical Reviews*, 1–5. <https://doi.org/10.15713/ins.ijcdmr.70>

- Jakus, A. E., Rutz, A. L., & Shah, R. N. (2016). Advancing the Field of 3D Biomaterial Printing. *Biomedical Materials*, 11, 14102. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/11/1/014102>
- Kasemo, B., & Gold, J. (1999). Implant Surfaces and Interface Processes. *Advances in Dental Research*, 13, 8–20. <https://doi.org/10.1177/08959374990130011901>
- Kelly, J. R., & Denry, I. (2008). Stabilized zirconia as a structural ceramic: An overview. *Dental Materials*, 24(3), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.05.005>
- Khalili, A. A., & Ahmad, M. R. (2015). A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 18149–18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>
- Khamverdi, Z., & Moshiri, Z. (2013). Zirconia: An Up-to-date Literature Review. *Avicenna Journal of Dental Research*, 4(1), 1–15.
- Kohal, R. J., Att, W., Bächle, M., & Butz, F. (2008). Ceramic abutments and ceramic oral implants. An update. *Periodontology* 2000, 47(1), 224–243. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00243.x>
- Lee, C.-T., Huang, Y.-W., Zhu, L., & Weltman, R. (2017). Prevalences of Peri-implantitis and Peri-Implant Mucositis: Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Dentistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>
- Lee, S.-Y., & Jiang, C.-P. (2015). Development of a Three-Dimensional Slurry Printing System Using Dynamic Mask Projection for Fabricating Zirconia Dental Implants. *Materials and Manufacturing Processes*, 30(12), 1498–1504. <https://doi.org/10.1080/10426914.2014.984208>
- Li, J., Liu, Y., Hermansson, L., & Söremark, R. (1993). Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts in vitro. *Clinical Materials*, 12(4), 197–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10148856>
- Liu, X., Huang, A., Ding, C., & Chu, P. K. (2006). Bioactivity and cytocompatibility of zirconia (ZrO₂) films fabricated by cathodic arc deposition. *Biomaterials*, 27(21), 3904–3911. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.007>

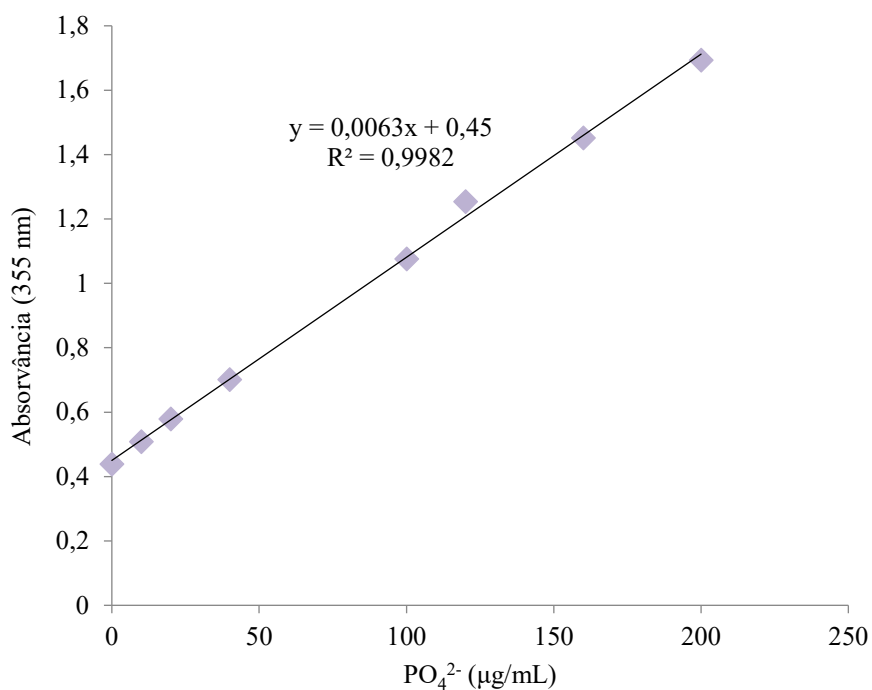
- Lughi, V., & Sergo, V. (2010). Low temperature degradation -aging- of zirconia: A critical review of the relevant aspects in dentistry. *Dental Materials*, 26(8), 807–820. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.04.006>
- Manicone, P. F., Iommetti, P. R., & Raffaelli, L. (2007). An overview of zirconia ceramics : Basic properties and clinical applications. *Journal of Dentistry*, 35, 819–826. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.07.008>
- Martin, V., & Bettencourt, A. (2017). Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Materials Science and Engineering: C*, 82, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.038>
- Mellinghoff, J. (2006). Erste klinische Ergebnisse zu dentalen Schraubenimplantaten aus Zirkonoxid. *Z Zahnärztl Implantol*, 22(4), 288–293. Retrieved from https://www.online-zzi.de/media/pdf/webarchiv/2006/ZZI_04_2006.pdf#page=26
- Montazerian, M., & Zanotto, E. D. (2016). Bioactive and inert dental glass-ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2–80. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35923>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nair, S. J., Chittaranjan, B., Avinash, A., Rajyalakshmi, R., Jagini, A., & Reddy, R. (2015). Zirconia dental implants : an overview. *International Journal of Dental and Health Sciences*, 2(4), 815–825.
- Nevins, M., Camelo, M., Nevins, M. L., Schupbach, P., & Kim, D. M. (2011). Pilot clinical and histologic evaluations of a two-piece zirconia implant. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 31(2), 157–163.
- Osman, R. B., Swain, M. V., Atieh, M., Ma, S., & Duncan, W. (2014). Ceramic implants (Y-TZP): are they a viable alternative to titanium implants for the support of overdentures ? A randomized clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*, 24, 1366–1377. <https://doi.org/10.1111/clr.12272>

- Osman, R. B., van der Veen, A. J., Huiberts, D., Wismeijer, D., & Alharbi, N. (2017). 3D-printing zirconia implants; a dream or a reality? An in-vitro study evaluating the dimensional accuracy, surface topography and mechanical properties of the printed zirconia implant and discs. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.08.018>
- Özkurt, Z., & Kazazoğlu, E. (2011). Zirconia dental implants: a literature review. *The Journal of Oral Implantology*, 37(3), 367–76. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-09-00079>
- Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W., & Milz, S. (2004). Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*, 24(6), 3743–3748. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.01.009>
- Piconi, C., & Maccauro, G. (1999). Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*, 20(1), 1–25. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00010-6)
- Qahtani, W. M. S. Al, Schille, C., Spintzyk, S., Qahtani, M. S. A. Al, Engel, E., Geis-Gerstorfer, J., ... Scheideler, L. (2016). Effect of surface modification of zirconia on cell adhesion, metabolic activity and proliferation of human osteoblasts, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1515/bmt-2015-0139>
- Ruoslahti, E., & Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4826), 491–497. <https://doi.org/10.1126/science.2821619>
- Sagvolden, G., Giaever, I., Pettersen, E. O., & Feder, J. (1999). Cell adhesion force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 471–476. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.471>
- Saijo, H., Igawa, K., Kanno, Y., Mori, Y., Kondo, K., Shimizu, K., ... Takato, T. (2009). Maxillofacial reconstruction using custom-made artificial bones fabricated by inkjet printing technology. *Journal of Artificial Organs*, 12(3), 200–205. <https://doi.org/10.1007/s10047-009-0462-7>
- Scarano, A., Di Carlo, F., Quaranta, M., & Piattelli, A. (2003). Bone response to zirconia

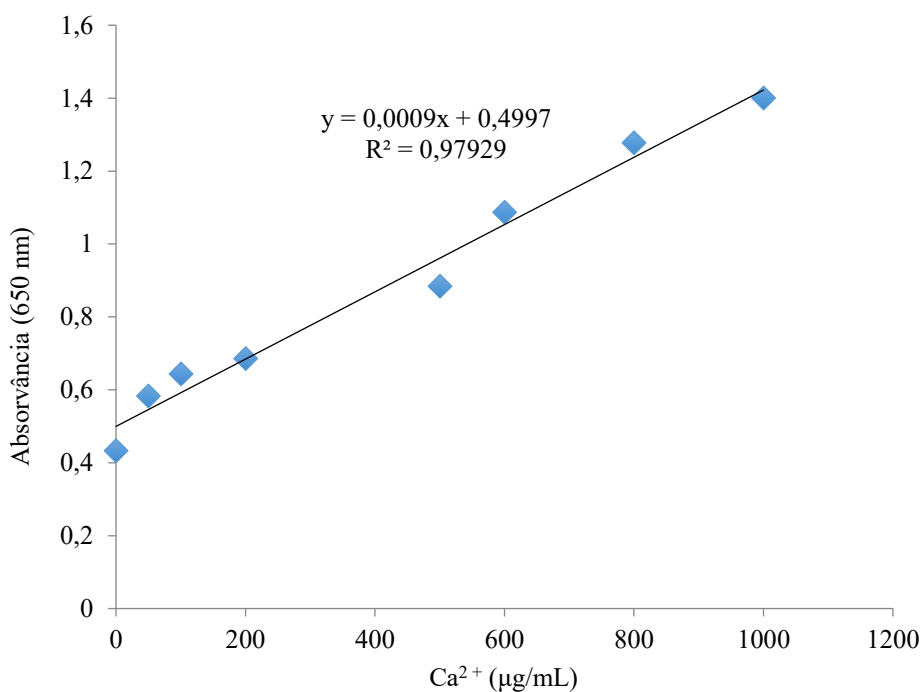
- ceramic implants: an experimental study in rabbits. *Journal of Oral Implantology*, 29, 8–12. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.192-195.403>
- Scientific, B. (n.d.). Influence of topography and wettability on biocompatibility. Retrieved September 21, 2017, from http://www.biolinscientific.com/zafepress.php?url=%2Fpdf%2FAttension%2FAplication%2FAT_AN_17_roughbio.pdf
- Steinemann, S. G. (1998). Titanium - the material of choice ? *Periodontology* 2000, 17, 7–21.
- Steve Gschmeissner. (n.d.). Osteoblast bone cell, SEM. Retrieved October 23, 2017, from https://www.sciencephoto.com/search?subtype=keywords&searchstring=osteoblast&sort_results=&per_page=48&page=2&previews=1&media_type=images&match_type=fuzzy&license=M&license=F&people=yes&people=no&orientation=all&closed=search_motion_filters&shot_audio=yes
- Strickstock, M., Rothe, H., Grohmann, S., Hildebrand, G., Zylla, I. M., & Liefeth, K. (2017). Influence of surface roughness of dental zirconia implants on their mechanical stability, cell behavior and osseointegration. *BioNanoMaterials*, 18, 1–10. <https://doi.org/10.1515/bnm-2016-0013>
- Tabari, K., Ansari, Z. J., Siavashani, M. A., & Eskandarion, S. (2014). Effect of Thermal and Mechanical Aging on Flexural Strength of Zirkonzahn and Mamut Zirconia Ceramics. *Journal of Dental School*, 32(3), 132–138.
- Teixeira, L. J. C., Anjos, C. M. dos, Soares, M. M., Jr., G. M. V., & Conz, M. B. (2009). Cultura de células na Implantologia Oral : revisão da literatura. *Revista Implant News*, 6(5), 479–483.
- Vagkopoulou, T., Koutayas, S. O., Koidis, P., & Strub, J. R. (2009). Zirconia in dentistry: Part 1. Discovering the nature of an upcoming bioceramic. *The European Journal of Esthetic Dentistry*, 4(2), 130–151.
- Vaidya, P., Mahale, S., Kale, S., & Patil, A. (2017). Osseointegration- A Review. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 16(1), 45–48. <https://doi.org/10.9790/0853-1601014548>

- Velasco, K. (2008). Engineering Tissue Constructs Through - Bioprinting. Retrieved August 6, 2017, from <http://bme240.eng.uci.edu/students/08s/velascok/references.html>
- Wang, G., Li, J., Lv, K., Zhang, W., Ding, X., Yang, G., ... Jiang, X. (2016). Surface thermal oxidation on titanium implants to enhance osteogenic activity and in vivo osseointegration. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep31769>
- Wang, J. J., Sanderson, B. J. S., & Wang, H. (2007). Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628(2), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.12.003>
- Wenz, H. J., Bartsch, J., Wolfart, S., & Kern, M. (2008). Osseointegration and clinical success of zirconia dental implants: a systematic review. *The International Journal of Prosthodontics*, 21(1), 27–36.
- Wróbel, E., Witkowska-Zimny, M., & Przybylski, J. (2010). Biological Mechanisms of Implant Osseointegration. *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja*, 5(6), 401–409.
- Yamashita, D., Machigashira, M., Miyamoto, M., Takeuchi, H., Noguchi, K., Izumi, Y., & Ban, S. (2009). Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dental Materials Journal*, 28(4), 461–470.
- Yoshimura, H. N., Molisani, a. L., Narita, N. E., Gonçalves, M. P., & Campos, M. F. De. (2007). Zircônia parcialmente estabilizada de baixo custo produzida por meio de mistura de pós com aditivos do sistema MgO-Y₂O₃-CaO. *Cerâmica*, 53, 116–132. <https://doi.org/10.1590/S0366-69132007000200003>

ANEXOS



Curva de calibração com uma série de soluções de (di)hidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) em TCA 15%.



Calibração feita a partir de uma série de soluções com cloreto de cálcio (CaCl_2) em TCA 15%.